



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU, BIOHEMIJU
I ZAŠTITU ŽIVOTNE SREDINE



MARINA FRANCIŠKOVIĆ

FITOHEMIJSKA KARAKTERIZACIJA I BIOLOŠKA AKTIVNOST
ODABRANIH VRSTA TRIBUSA
URTICEAE I PARIETARIEAE (URTICACEAE JUSS.)

- DOKTORSKA DISERTACIJA -

Novi Sad, 2015.

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u laboratorijama za biohemiju lekovitog bilja i tečnu hromatografiju Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, eksperimenti na ćelijskim linijama su urađeni na Departmanu za farmakologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Granadi, dok je uticaj vazdušnog zagađenja na akumulaciju teških metala i fiziološke parametre koprive urađen na Naučnom institutu za veterinarstvo „Novi Sad“ i u laboratoriji za fiziologiju biljaka Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu.

Koristim priliku da se zahvalim svima koji su dali doprinos u izradi ove doktorske disertacije.

Na prvom i najvažnijem mestu, veliko hvala mom mentoru prof. dr Nedi Mimici-Dukić na ukazanom poverenju u omogućenoj prilici da se bavim naukom na najlepší mogući način. Svojim optimizmom i vedrim duhom činite da svaki posao bude zadovoljstvo i da se svi osećamo ponosni na uspehe naše grupe.

Doc. dr Dejanu Orčiću na velikoj pomoći i usmerenju pri mojim prvim koracima u laboratoriji, na ogromnoj pomoći vezanoj za ovu doktorsku disertaciju počevši od sakupljanja biljnog materijala, preko obrade eksperimentalnih podataka do diskusije samih rezultata. Veliko hvala na usađenoj naučnoj sumnji i kritičkom pristupu svakom rezultatu, privilegija je imati takvog stručnjaka kao kolegu.

Prof. dr Goranu Anačkovu i prof. dr Biljani Božin se zahvaljujem na pomoći prilikom odabira teme, za sakupljanje i determinaciju biljnog materijala kao i na pokazanom interesovanju i savetima u vezi ove doktorske disertacije.

Doc. dr Emiliji Svirčev na brojnim korisnim savetima pri izvođenju laboratorijskih eksperimenata, velikoj podršci u toku rada na doktorskoj disertaciji, kao i za svakodnevna druženja u našoj 9-ci.

Doc. dr Nataši Simin za njen optimizam kojim zrači, uz koji je svaka obaveza lakša i lepša, i veliko hvala na mnogim malim i velikim savetima.

Mojim „lafibovcima“ msc Kristini Bekvalac, doc. dr Ivani Beari, doc. dr Mariji Lesjak i msc Filipu Šibulu zahvaljujem se na pomoću u eksperimentalnom radu, podršci, i na pozitivnoj atmosferi na poslu kao i za lepa druženja van njega.

Dr Marku Kebertu i dr Sanji Vlajsavljević na pozitivnoj energiji i prijateljskoj podršci.

Svim kolegama sa Katedre za biohemiju i hemiju prirodnih proizvoda hvala za pomoć i podršku u toku izrade ovog rada.

Agradecer especialmente a la Doctora Raquel González Pérez, y a los profesores Fermín Sánchez Medina y Olga Martínez Agustín por su apoyo y colaboración durante el desarrollo de los análisis desarrollados en el laboratorio de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, así como a los compañeros Andrea, Isabel, Borja, Belén, Cristina y Mercedes. Gracias por la paciencia mostrada, ayuda y amistad.

A mi querido Antonio, por su apollo imenso en los momentos duros, por su amor y paciencia y por la paz que me da.

Svojoj porodici se od srca zahvaljujem na razumevanju i ljubavi, posebno mojoj majci za beskrajnu podršku koju mi pruža u životu.

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Opšti deo	5
2.1. Sistematska pripadnost ispitivanih vrsta	7
2.1.1. Familija Urticaceae Jussieu	7
2.1.2. Rod <i>Urtica</i> L.	8
2.1.2.1. <i>Urtica dioica</i> L. (velika kopriva, žara).....	8
2.1.2.2. <i>Urtica kioviensis</i> Rogow. (barska kopriva, Kijevska kopriva).....	9
2.1.3. Rod <i>Parietaria</i> L.	11
2.1.3.1. <i>Parietaria officinalis</i> L. (vijošnica).....	11
2.1.3.2. <i>Parietaria judaica</i> L. (obična vijošnica)	11
2.1.3.3. <i>Parietaria lusitanica</i> L. subsp. <i>lusitanica</i> (portugalska vijošnica).....	12
2.1.3.4. <i>Parietaria serbica</i> Pančić (srpska vijošnica).....	12
2.2. Hemijski sastav ispitivanih vrsta	13
2.2.1. Fenolne kiseline.....	14
2.2.2. Flavonoidi i njihovi glikozidi	18
2.2.3. Lignani.....	22
2.3. Molekulske osnove bolesti	26
2.3.1. Slobodni radikali i oksidativni stres	26
2.3.2. Acetilholinesteraza	31
2.3.3. Nespecifični imuni odgovor	37
2.3.3.1. Eikozanoidi kao medijatori inflamacije.....	39
2.3.3.2. Uloga intestinalnih epitelnih celija u nespecifičnom imunom odgovoru	42
2.4. Farmakološko delovanje i primena ispitivanih vrsta.....	51
2.4.1. <i>Urticae herba</i> (herba koprive).....	51
2.4.2. <i>Urticae radix</i> (koren koprive)	57
2.4.3. Farmakološko i alergeno dejstvo vrsta roda <i>Parietaria</i> L.....	59
3. Eksperimentalni deo	61
3.1. Specifične hemikalije i reagensi korišćeni u eksperimentima.....	63
3.2. Biljni materijal i priprema ekstrakata	64
3.2.1. Metanolni ekstrakti.....	65
3.2.2. Infuzi (vodeni ekstrakti)	66
3.3. LC-DAD-MS i LC-MS/MS analiza	66
3.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola i flavonoida.....	69
3.5. Ispitivanje antioksidantnog potencijala ekstrakata	70

3.5.1. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije DPPH [•] radikala	70
3.5.2. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije NO [•] radikala.....	71
3.5.3. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije SOA radikala	72
3.5.4. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije [•] OH radikala.....	73
3.5.5. Određivanje sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije	74
3.5.6. Određivanje ukupnog redukcionog kapaciteta (FRAP test)	75
3.6. Ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti ekstrakata	76
3.7. Određivanje sposobnosti inhibicije acetilholinesteraze	78
3.8. Ispitivanje uticaja ekstrakata na imuni odgovor i proliferaciju ćelijskih linija IEC18 i Caco2	79
3.8.1. Uslovi gajenja ćelijskih kultura	79
3.8.2. Određivanje citotoksicnosti ekstrakata merenjem aktivnosti enzima LDH.....	79
3.8.3. Merenje sekrecije citokina.....	80
3.8.4. Određivanje uticaja na signalne puteve u sekreciji citokina rat MCP1 i GRO α	82
3.8.5. Blokiranje ekspresije gena za TLR4 i MyD88 letiviranim česticama	83
3.8.6. Izolacija i kvantifikacija proteina iz ćelija.....	84
3.8.7. Western blot.....	85
3.8.9. Efekat epitelizacije (zarastanja rane).....	86
3.9. Određivanje sadržaja teških metala i fizioloških parametara u herbi koprive (<i>Urtica dioica</i> L.).....	87
4. Rezultati i diskusija	89
4.1. Hemijski sastav ekstrakata ispitivanih vrsta	91
4.1.1. Kvalitativna LC-DAD-MS i LC-MS/MS analiza.....	91
4.1.2. Identifikovana jedinjenja po klasama	92
4.1.2.1. Fenolne kiseline i njihovi derivati	92
4.1.2.2. Flavonoidi i njihovi glikozidi	94
4.1.2.3. Lignani.....	98
4.1.2.4. Aminoacil-derivati.....	99
4.1.2.5. Komponente Mw = 310 - 330.....	103
4.1.2.6. Masne kiseline	104
4.1.3. Kvantitativna LC-MS/MS analiza fenolnih jedinjenja	105
4.1.3.1. Markeri na nivou rodova i vrsta.....	114
4.1.3.2. Distribucija kvantifikovanih fenolnih komponenti po biljnim organima	119
4.1.4. Sumiranje kvalitativne i kvantitativne LC-DAD-MS analize.....	119
4.1.4.1. Vrste iz roda <i>Urtica</i>	121
4.1.4.2. Vrste iz roda <i>Parietaria</i>	125
4.1.5. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih fenola i flavonoida	131
4.2. Antioksidantna aktivnost ekstrakata	134
4.3. Antiinflamatorna aktivnost ekstrakata.....	145

4.4. Inhibicija enzima acetilholinesteraze	149
4.5. Uticaj ekstrakata na imuni odgovor i proliferaciju intestinalnih epitelnih ćelija IEC18 I Caco2.....	151
4.5.1. Uticaj ekstrakata na sekreciju proinflammatoryh citokina (rat MCP1 i GRO α) iz IEC18 ćelija	152
4.5.1.1. Uticaj ekstrakata na signalne puteve u produkciji rat MCP1 i GRO α	155
4.5.1.2. Uticaj ekstrakata na aktivaciju TLR4 i MyD88 signalnog puta	157
4.5.2. Uticaj ekstrakata na ekspresiju COX-2 u IEC18 ćelijama	158
4.5.3. Efekat epitelizacije	159
4.5.4. Uticaj ekstrakata na sekreciju proinflammatoryh citokina (IL-8 i humanog MCP1) iz Caco2 ćelija	163
4.5.5. Uticaj ekstrakata na proliferaciju Caco2 ćelija.....	164
4.6. Uticaj zagađenosti sredine na akumulaciju teških metala, fiziološke parametre i biološki potencijal vrste <i>Urtica dioica</i> L.	166
5. Zaključak	169
6. Summary	175
7. Literatura	181
8. Prilog	211
8.1. Podaci o pripremi metanolnih ekstrakata	213
8.2. Podaci o pripremi infuza (vodenih ekstrakata).....	216
8.3. Rezultati kvalitativne LC-DAD-MS i LC-MS/MS analize	217
8.4. Kvantitativna analiza odabranih fenolnih jedinjenja u ekstraktima LC-MS/MS tehnikom	243
8.5. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola i flavonoida	256
8.6. Antioksidantni potencijal ekstrakata	262
8.7. Antiinflammatoryh potencijal ekstrakata	297
8.8. Inhibicija enzima acetilholinesteraze	301
8.9. Eksperimenti na ćelijskim linijama IEC18 i Caco2	303

1. Uvod

Lekovite biljke su predstavljale jedne od prvih terapijskih sredstava u historiji čovečanstva. Zapažanjem i beleženjem blagotvornih dejstava različitih biljaka na ljudski organizam, nastala je tradicionalna medicina. Ovaj oblik lečenja je bio i jedini, do pojave prvih sintetskih lekova početkom 19. veka, kada je upotreba bilja u zvaničnoj medicini blago zapostavljena. Međutim, dužom i obimnijom upotrebom sintetskih lekova javljaju se brojni negativni efekti, te lekovite biljke ponovo postaju interesantne i modernoj medicini. Zajedno sa njihovom upotrebom, povećao se obim naučnih istraživanja posvećen lekovitim biljkama. Ovaj naučni pristup u mnogome je pomogao i opravdao vekovnu upotrebu brojnih biljnih preparata određivanjem njihovog hemijskog sastava i definisanjem konkretnih aktivnih komponenti. Takođe, puno pažnje je posvećeno utvrđivanju tačnog mehanizma dejstva pojedinačnih aktivnih komponenti, iako je u mnogim slučajevima potvrđeno da je kompleksnost hemijskog sastava biljnih preparata ujedno jedna od njihovih glavnih prednosti.

Najpoznatiji predstavnik familije Urticaceae – *Urtica dioica*, odnosno kopriva, se još od antičkih vremena koristi u ishrani ali i kao lekovita biljka (Upton, 2013). Zbog prisustva „žarnih dlaka“ na površini koje nakon kontakta sa kožom izazivaju neprijatan osećaj pečenja nazvan urtikarija, sveža biljka se upotrebljavala u terapiji artritisa i paralizovanih udova jer je povećavala cirkulaciju i osećaj toplote (Green, 1824). U drevnom Egiptu su koristili infuz koprive za olakšavanje tegoba artritisa i lumbaga (Harrison, 1966). Hipokrat i njegovi sledbenici su opisali čak 61 upotrebu koprive u različitim terapijama (Kavalali, 2003). Vojnici Rimskih trupa su navodno bičovali svoje noge i ruke svežom koprivom nakon dugih marševa da bi se zagrejali i poboljšali cirkulaciju. Zabeleženo je da su iz tog razloga sa sobom poneli seme tzv. rimske koprive (*U. pilulifera*) na pohod u Veliku Britaniju (Grieve, 1931). Ovakva praksa urtikacije tj. primene sveže biljke koprive kao rubefacijensa postao je standardni narodni lek u terapiji artritisa, reumatizma i mišićne paralize (Woodville, 1810). U II veku naše ere, grčki lekar Galen zapisao je da se listovi koprive mogu koristiti kao diuretik i laksativ, za lečenje gangrenoznih rana, otoka, krvarenja nosa, za ublažavanje tegoba menstruacije, astme itd. (Bombardelli and Morazzoni, 1997; Kavalali, 2003). Pored primene koprive u medicini, ona se koristi u ishrani kao zeljasto povrće zbog izuzetnih nutritivnih svojstava. Najčešće se koristi za pripremu supa, čajeva, sokova ili pripremu pita-zeljanica (Kavalali, 2003). Razni tonici od koprive se koriste za oporavak iscrpljenog organizma (u slučajevima anemije i nakon dugih bolesti) pre svega zbog visokog sadržaja vitamina C i gvožđa (Kavalali, 2003, Grieve, 1931). Zabeležena je i nešto neobičnija primena koprive - za proizvodnju tkanina (još od bronzanog doba). Stabljika koprive sadrži izuzetno čvrsta vlakna, čak je u toku Prvog svetskog rata u Nemačkoj kopriva bila glavni izvor vlakana u tekstilnoj industriji, u nedostatku pamuka (Kavalali, 2003). Dekokt koprive, intenzivno zelene boje, je služio za bojenje vune u Rusiji (Grieve, 1931). Kopriva je samonikla biljka i veoma rasprostranjena te je lako dostupna. Međutim, zbog svih prethodno navedenih izuzetnih svojstava počinje i da se planski gaji, pre svega u zemljama Istočne Evrope (Upton, 2013).

Vrste roda *Parietaria*, koje takođe pripadaju familiji Urticaceae, su poznate tradicionalnoj medicini, ali ipak njihova primena nije ni približno široka kao je slučaj sa koprivom, već su mnogo poznatije kao jedne od najvažnijih uzročnika alergijskih reakcija, naročito u Mediteranskom području. U tradicionalnoj medicini brojnih zemalja, upravo mediteranskog područja (Španija, Italija, Portugalija), ekstrakt vrste *P. judaica* se koristi kod kardiovaskularnih tegoba (Akkerreta, 2009; Caverio i sar, 2011; Akkerreta i sar, 2013). Dekokt vrste *P. judaica* ima diuretska, antireumatska svojstva i koristi se kod genitalno-urinarnih infekcija (Cornara i sar, 2009). Kao diuretik se primenjuje i dekokt lista vrste *P. officinalis*, zatim za ublažavanje gastrointestinalnih smetnji a u ređim slučajevima u tretmanu glavobolja i hipertenzije (Tuttolomondo i sar, 2014).

Biljne vrste koje pripadaju rodovima *Urtica* i *Parietaria* su dobro poznate u tradicionalnoj medicini, međutim, u modernim naučnim istraživanjima zastupljena je pretežno samo vrsta *U. dioica* (kopriva). S obzirom da je njeno blagotvorno dejstvo potvrđeno kako dugovekovnom primenom u narodnoj medicini tako i modernim ispitivanjima postoji potreba da se posveti pažnja i ostalim vrstama srodnim koprivi, a slabo ili potpuno neispitanim.

Zbog toga je za predmet istraživanja ove doktorske disertacije odabrano ispitivanje hemijskog sastava i biološkog potencijala sledećih biljnih vrsta koje pripadaju pomenutim rodovima: *U. dioica* supsp. *dioica* var. *pubescens*, *U. dioica* supsp. *dioica* var. *dioica*, *U. kioviensis*, *P. officinalis*, *P. lusitanica* subsp. *lusitanica*, *P. judaica* subsp. *judaica* i *P. serbica*. U okviru ove disertacije sprovedena su sledeća istraživanja:

- ❖ detaljna hemijska karakterizacija sledećim metodama:
 - kvalitativna analiza primenom tečnrohromatografskih metoda (LC-DAD-MS i LC-MS/MS);
 - kvantitativna analiza odabranih fenolnih jedinjenja primenom LC-MS/MS tehnike;
 - spektrofotometrijske metode za određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i ukupnih flavonoida;
- ❖ određivanje potencijalnih hemotaksonomskih markera na nivou rodova i vrsta;
- ❖ ispitivanja bioloških aktivnosti ekstrakata:
 - antioksidantni potencijal ekstrakata je određen njihovom sposobnošću da neutrališu sledeće radikale *in vitro*: DPPH[•], NO[•], SOA i [•]OH radikal kao i testom inhibicije lipidne peroksidacije a FRAP testom je procenjena redukciona sposobnost ekstrakata;
 - *ex vivo* određivanje antiinflamatorne aktivnosti ekstrakata merenjem potencijala inhibicije biosinteze metabolita arahidonske kiseline u humanim trombocitima;
 - testom određivanja sposobnosti ekstrakta da inhibiraju enzim acetilholinesterazu;
 - određivanjem uticaja sedam odabranih metanolnih ekstrakata na imuni odgovor i proliferaciju ćelijskih linija IEC18 i Caco2 kao model sistema epitela gastrointestinalnog trakta;
 - merenjem uticaja ekstrakata na sekreciju citokina rat MCP1 i GRO α iz IEC18 ćelija, i definisanje preko kojih signalnih puteva menjaju obrazac sekrecije;
 - određivanjem uticaja ekstrakata na LPS-om indukovanu ekspresiju COX-2 enzima u IEC18 ćelijama;
 - utvrđivanjem uticaja ekstrakata na ekspersiju proliferativnog antigena (PCNA) iz IEC18 ćelija;
 - merenjem uticaja ekstrakata na sekreciju citokina humanog MCP1 i IL-8 iz Caco2 ćelija;
 - utvrđivanjem uticaja ekstrakata na ekspersiju proliferativnog antigena (PCNA) i vilina iz Caco2 ćelija.
 - Određivanje uticaja izlaganja vađdušnom zagađenju na akumulaciju teških metala, fiziološke parametre i biološku aktivnost herbe vrste *U. dioica*.

2. Opšti deo

2.1. SISTEMATSKA PRIPADNOST ISPITIVANIH VRSTA

2.1.1. Familija Urticaceae Jussieu

Familija Urticaceae spada u red Rosales i zajedno sa familijama Cannabaceae, Cecropiaceae, Celtidaceae, Moraceae i Ulmaceae formira granu (eng. *clade*) pod nazivom urtikalne rozide (*Urticalean Rosids*) na osnovu rezultata molekularnih analiza sprovedenih na tri sekvence (rbcL, trnL-F i ndhF), dopunjene sličnostima u pojedinim morfološkim karakteristikama i sličnom citogenetičkom strukturom (Kenneth i sar, 2002). Međutim, tradicionalna morfološka sistematika ove grupe, bazirana na korelaciji morfoloških karaktera i frekvencijama njihove učestalosti kod većine grupa, familiju Urticaceae kao i sve ostale navedene familije, svrstava u zaseban red Urticales hamamelidne grupe (Hammamelidiidae) dikotila (Takhtajan, 2009).

Naziv Urticaceae dobijen je iz naziva najpoznatijeg roda ove familije - *Urtica*, a naziv samog roda je izveden iz latinske reči *uro* što znači goreti. Naime, biljne vrste koje pripadaju ovom rodu karakteriše prisustvo žarnih dlaka na površini listova i stabljika koje u kontaktu sa kožom izazivaju osećaj žarenja tj. osećaj da koža gori.

Morfološke karakteristike familije Urticaceae – to su uglanom listopadne, zeljaste, jednogodišnje i višegodišnje, biljke, ili niski žbunovi, retko lijane i niska drveta. Stabljike su obično maljave, ponekad sa žarnim dlakama, dok zalisci mogu biti prisutni ili odsutni. Listovi su prosti sa drškom, i mogu biti naspramno ili naizmeničko raspoređeni. Cvetovi su jednopolni (biljke mogu biti dvodome ili jednodome) ili dvopolni, aktinomorfni, sa prostim cvetnim omotačem i sitni. Dalje, cvetovi su grupisani u terminalne ili složene racemozne cvasti kitice, sastavljene od dihajizuma ili glomerula. Muški cvetovi imaju četiri do pet listića cvetnog omotača, isto toliko prašnika i ponekad prisutan rudimentirani tučak. Ženski cvetovi su obično sedeći, sa dva do četiri listića cvetnog omotača koji obično razrasta i ostaje na plodu dok staminodije mogu biti prisutne ili odsutne. Tučak ženskog cveta se sastoji od jednog plodnog listića, plodnik je natcvetan, jednook, sa jednim semenim zametkom, stubić je kratak ili ga nema a žig može biti glavičast, glavičasto četkast, šilast, končast, jezičast ili štitast. Dvopolni cvetovi imaju cvetni omotač od četiri listića, isto toliko prašnika i jedan tučak. Plod je orašnica, koja je obično obavijena razraslim cvetnim omotačem, ili koštunica (Tatić i Petković, 2012; Edmondson, 1996).

Biljne vrste koje pripadaju ovoj familiji imaju široku primenu. Svakako je najpoznatije što se vlakna stabljika određenih vrsta (naročito *Boehmeria nivea* i vrste iz rodova *Urtica* i *Girardinia* - *Girardinia diversifolia* subsp. *triloba*) koriste za pravljenje platna, ribarskih mreža i kanapa kao i za pravljenje nekih industrijskih materijala. Mladi izdanci vrsta iz rodova *Girardinia*, *Laportea* i *Urtica* se kuvaju i koriste kao povrće. Veliki broj vrsta ove familije se koriste u tradicionalnoj medicini i kao ukrasne biljke ali su vrste rodova *Urtica* i *Parietaria* veoma zastupljene kao korovske vrste u usevima (Jiarui i sar, 2003; Boufford, 1997; Kubitzki, 1993).

Porodica Urticaceae obuhvata oko 45 (47) rodova sa oko 1300 vrsta rasprostranjenih pretežno u tropskim i subtropskim predelima, ali i u umerenom pojasu. U okviru podele unutar familije Urticaceae, prema Friis-u (1989), rodovi su grupisani u pet tribusa i to:

1. Tribus Urticeae [= Ureereae (Gaud.) Wedd.(1854)] - obuhvata deset rodova,
2. Tribus Lecantheae Wedd. (1854) [= Elatostemeae Gaud. ("1826". 1830), takson iznad ranga roda bez definisanog statusa = tribus Procridaeae Wedd. (1856)]. - obuhvata sedam rodova;
3. Tribus Boehmerieae (Gaud.) Wedd. (1854). - obuhvata 19 rodova;
4. Tribus Parietarieae (Gaud.) Wedd. (1854). - obuhvata pet rodova;
5. Tribus Forsskaoleae (Gaud.) Wedd. (1854). - obuhvata četiri roda.

U ovom radu fokus je bio na dva tribusa: Urticeae i Parietarieae. Tribus Urticeae obuhvata deset rodova: *Urtica*, *Hesperocnide*, *Nanocnide*, *Obetia*, *Laportea*, *Discocnide*, *Girardinia*, *Dendrocnide*, *Urea* i *Gyrotaenia*. Tribus Parietarieae obuhvata 5 rodova: *Gesnouinia*, *Hemistylus*, *Parietaria*, *Soleirolia* i *Rousselia*.

U Srbiji raste sedam vrsta iz rodova *Urtica* i *Parietaria* od kojih je šest obrađeno u ovom radu.

2.1.2. Rod *Urtica* L.

Naziv roda *Urtica*, kao što je ranije napomenuto, potiče od latinske reči *uro* što znači goreti ili *urere* što znači bosti i zapravo opisuje osećaj toplote i iritacije kože na mestu uboda žarnih dlaka koje se nalaze biljnim vrstama ovoga roda. Prisustvo žarnih dlaka, ispunjenih acetilholinom, mravljom kiselinom, 5-hidroksitriptaminom i histaminom, je ujedno i glavna karakteristika koja vrste ovoga roda odvaja od vrsta roda *Parietaria* (Grieve, 1931; Upton, 2013).

Morfološke karakteristike – to su jednogodišnje i višegodišnje zeljaste biljke, retko polužbunovi, sa žarnim dlakama. Stabljika može biti uspravna, poluuspravna ili puzeća, četvoro brida. Zalisci mogu biti slobodni ili srasli. Listovi su naspramno raspoređeni, sa drškom, dok liska može biti eliptična, jajasta ili okrugla, na obodu nazubljena do testerasta ili pravilno režnjevita, sa tri do pet (retko sedam) nerava. Cvetovi su jednopolni ili dvopolni, grupisani u posebne ili zajedničke cvasti kitice, koje su sastavljene od dihozijuma. Brakteje su usko trouglaste do lancetaste, bez kukastih dlaka a biljke mogu biti dvodome ili jednodome. Muški cvet ima cvetni omotač od četiri jednaka listića i isto toliko prašnika, do je tučak zakržljao i peharast. Ženski cvet ima cvetni omotač od četiri listića (dva unutrašnja duža, dva spoljašnja kraća) i ostaje na plodu. Ženski cvet nema kukasto savijene dlake ni staminodije. Njegov plodnik je prav, stubić kratak ili ga nema a žig je glavičasto-četkast. Plod je orašnica, sedeći, jajast ili deltoidan, bočno je spljošten i okružen sa dva unutrašnja listića cvetnog omotača (Tatić i Petković, 2012; Ball i Geltman, 1996; Kubitzki, 1993).

Rod *Urtica* obuhvata oko 45 (47) vrsta rasprostranjenih pretežno u umerenom pojasu, ali i u tropskim planinskim predelima (Tatić i Petković, 2012).

2.1.2.1. *Urtica dioica* L. (velika kopriva, žara)

Naziv vrste potiče od Grčke reči *oikia* - kuća, tj. latinski *dioica* - dve kuće i odnosi se na činjenicu da je ova biljna vrta dvodoma tj. ima jednopolne, muške i ženske cvetove na različitim biljkama (Woodville, 1810).

Morfološke karakteristike – to je višegodišnja zeljasta biljka, visine 30-150 cm (*Slika 2.1.*). Ima drvenast, valjkast i razgranat rizom. Stabljika je uspravna, četvoro brida, nerazgranata ili razgranata, sa kratkim čekinjama ili dugačkim žarnim dlakama. Zalisci su dugi, (2)5-8 mm, linearni i slobodni. Listova ima po 2, retko po 3 u pršljenu. Lisna drška je duga 2,5-4 cm, sa žarnim i čekinjastim dlakama. Sama liska je duga 5-15 cm a široka 2-6 cm. Može biti jajasta ili lancetasta, na osnovi je zaobljena do srcasta a na vrhu zašiljena. Liska ima tri do pet nerava, na obodu je grubo testerasta, ponekad dvostruko. Na licu su proređene žarne i čekinjaste dlake a na naličju, obično duž nerava ima guste, dugačke žarne i čekinjaste dlake. Cvast je duga 3-7 cm, metličasta, ima dršku i jednopolna je. Biljke su dvodome ili ređe jednodome. Ženski cvet ima omotač od četiri listića srasla u donjem delu: dva spoljašnja duga 0,8-1,2 mm, linearna do usko lopatičasta ili lancetasta i dva unutrašnja duga 1,4-1,8 mm, široka 1,1-1,3 mm, jajasta do široko jajasta. Plod je dug 1-1,2(1,4) mm, širok 0,7-0,9 mm, jajast, blago spljošten, sivo-braon i okružen je listićima cvetnog omotača.

Stanište - raste od nizije do 1800 m n.v., prvenstveno na zemljištu bogatom azotom, na vrlo različitim staništima: vlažna mesta, šumske sečine, rečne doline; torovi, njive, bašte, voćnjaci; ruderalna staništa pored puteva i u naseljima (dvorišta, đubrišta, staje) u zajednicama *Sambucetum ebuli*, *Onopordetum acanthi*, *Chenopodion subalpinum*. Ova vrsta je skoro kosmopolitska, rasprostranjena antropogeno dok je njen primarni areal u Evroziji. Pripada Evroazijskom-severnoameričkom flornom elementu (Tatić i Petković, 2012; Ball i Geltman, 1996; Kubitzki, 1993).

Kopriva se smatra korovskom vrstom koja raste gotovo svuda oko nas. S toga, većina biljnog materijala koja se prikuplja u komercijalne svrhe jesu samonikle biljke iako postoje i plantaže na kojima se ciljano gaji kopriva. Kako raste potražnja za ovom biljnom vrstom, naročito za proizvodnju vlakana, raste obim namenskog gajenja koprive, naročito u zemljama Istočne Evrope (Bombardelli i Morazzoni, 1997; Patten, 1993; Wichtl, 2004).

U ovom radu ispitivana su dva varijeteta tipične podvrste *Urtica dioica* subsp. *dioica*:

- *Urtica dioica* L. 1753 subsp. *dioica* var. *pubescens* (Ledeb.) Tratuv. 1855

- *Urtica dioica* L. 1753 subsp. *dioica* var. *dioica*.

2.1.2.2. *Urtica kioviensis* Rogow. (barska kopriva, Kijevska kopriva)

Ovu vrstu je prvi put opisao ruski naučnik A.S. Rogowitsch 1843. godine u blizini Kijeva pa je ova vrsta po tome dobila i ime. Iako ova vrsta nije ispitivana i ni blizu pominjana u literaturi (ni u starim spisima, ni u modernim naučnim radovima) kao vrsta *Urtica dioica*, postoje dokazi o postojanju *U. kioviensis* još u periodu mezolitika (srednjeg kamenog doba). Naime, u Istočnoj Nemačkoj su nađeni fosilizovani ostaci semena ove vrste koje potiče iz tog perioda (Wolters i sar. 2005).

Morfološke karakteristike – to je višegodišnja zeljasta, jarko zelena biljka, visine 8-120 (200) cm (Slika 2.2.). Ima puzeći rizom. Stabljika je uspravna, obično je granata i manje-više gola, sa proređenim žarnim dlakama, pri osnovi ima adventivne korenove. Zalisci su krupni i široko trouglasti, donji su slobodni a gornji potpuno ili samo na osnovi međusobno srasli. List je sa drškom a liska je izduženo jajasta ili izduženo lancetasta, manje-više gola, na osnovi zaobljena, plitko srcasta ili klinasta dok je na vrhu dugačko naglo ušiljena a na obodu testerasta. Cvasti su jednopolne a biljka je jednodoma. Ženski cvet je manje-više go, sa cvetnim omotačem od četiri listića: dva spoljašnja koji su dugi do 1 mm, dva unutrašnja duža 1/2-2/3, koji ostaju na plodu. Plod je dug 1,5 mm, jajast i okružen listićima cvetnog omotača skoro iste dužine kao plod.

Stanište - izrazito vlažna staništa: močvarna, dugotrajno plavljena i sa visokom podzemnom vodom, u zajednicama: *Salicetum cinereae*, *Scirpo - Phragmitetum austro - Orientale urticetosum kioviensis*, *Saliceto cinereae - Fraxinetum angustifoliae*, *Genisto elatae - Quercetum roboris* (Tatić i Petković, 2012; Ball i Geltman, 1996; Kubitzki, 1993).

Vrsta *Urtica kioviensis* je endemična u području Centralne i Istočne Evrope ali je, na žalost, u većini zemalja na listi ugroženih vrsta. U Češkoj Republici je proglašena za izumrlu vrstu (Čeřovský i sar, 1999) ali je ipak 2001. godine registrovano prisustvo ove vrste u Nacionalnom parku Ranšpurk (Danihelka i Lepší, 2004). U Belorusiji je označena kao ugrožena vrsta, a u Mađarskoj kao potencijalno ugrožena (Ermakova, 2005; Király, 2007). U Srbiji, ova vrsta je na spisku strogo zaštićenih biljnih vrsta („Službeni glasnik Republike Srbije“, broj 36/09).



Slika 2.1. *Urtica dioica* L. (Thomé, 1885)



Slika 2.2. *Urtica kioviensis* Rogow.
(http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b3/Urtica_kioviensis_sl4.jpg)



Slika 2.3. *Parietaria officinalis* L. (Thomé, 1885)



Slika 2.4. *Parietaria judaica* L. (foto: Francišковиć, 20.10.'13)



Slika 2.5. *Parietaria lusitanica* L.
<http://www.albufera.com/parque/content/parietaria-lusitanica-l>

2.1.3. Rod *Parietaria* L.

Vrste koje pripadaju rodu *Parietaria* su biljke zastupljene u Mediteranskom području gde njihov polen predstavlja glavne uzročnike alergijskog rinitisa (Colombo i sar, 2003). Za njih je karakteristično da rastu na stenama i u pukotinama zidova na osnovu čega je i sam rod dobio ime - na latinskom *paries* znači zid.

Morfološke karakteristike – to su zeljaste biljke, jednogodišnje ili višegodišnje. Imaju manje ili više malja, sa kukasto savijenim ili pravim dlakama ali, za razliku od prethodno opisanog roda, nemaju žarnih dlaka. Stabljika je uspravna, poluuspravna ili delimično polegla, često je razgranata od osnove a ponekad je pri osnovi odrvenela. Zalisci nedostaju. Listovi su naizmenično raspoređeni, rombični, deltoidni, jajasti, okrugli, usko eliptični ili lancetasti, na obodu su celi i nemaju lisne zaliske. Cvetovi sujednopolni ili dvopolni, grupisani u složene racemozne od tri do višecvetne cvasti. U donjem delu biljke cvetovi su dvopolni i muški, a u gornjem delu su ženski. Brakteje su linearne ili lancetaste, bez kukasto savijenih dlaka a biljke jednodome. Cvetni omotač se sastoji iz četiri listića, koji su kod ženskih cvetova srasli pri osnovi u cev i mnogo kraći nego kod muških cvetova i ostaju na plodu. Muški cvet ima četiri prašnika i vrlo mali, rudimentarni tučak. Ženski i dvopolni cvetovi su sa jednim tučkom, plodnik je natcvetan i jednook. Stubić je kratak ili ga nema a žig je četkast ili lopatičast dok su staminodije odsutne. Plod je orašica, može biti jajast, šiljat ili ušiljen, spljošten i okružen je cvetnim omotačem (Tatić i Petković, 2012; Ball, 1996).

Rod *Parietaria* obuhvata oko 20 vrsta rasprostranjenih u umerenoj i suptropskoj zoni. U Evropi je zastupljeno osam vrsta, od toga u Srbiji četiri vrste (Tatić i Petković, 2012).

2.1.3.1. *Parietaria officinalis* L. (vijošnica)

Ova vrsta je višegodišnja biljka, visine 30-100 cm (*Slika 2.3.*). Rizom je končast i dugačak. Stabljika je uspravna, obično nerazgranata, sa kratkim sivim dlakama i krta. List je dug 4-10 cm, sa drškom koja je kraća od liske. Liska je jajasta do lancetasta, na osnovi je klinasto sužena a na vrhu dugačko ušiljena do je na bodu cela, gola ili retko dlakava i sjajna. Cvetovi su grupisani u loptaste kitice koje su uvek kraće od lisne drške. Brakteje nisu srasle i kraće od cvetnog omotača. Listići cvetnog omotača su obično iste dužine kao prašnici. Plod je dug 2-2,5 mm, crn i okružen listićima cvetnog omotača (Tatić i Petković, 2012; Ball, 1996).

Stanište - raste na stenama, u vlažnim šumama i šibljacima, u zajednicama: *Carici humilis* - *Pinetum nigrae*, *Alnetum glutinosae*, *Helleboro odori* - *Fagetum moesiaca*, *Fraxino excelsioris* - *Coryletum colurnae*, *Acer intermedium*, kao i na zidovima, pored puteva (u kanalima), uz ograde (Tatić i Petković, 2012).

2.1.3.2. *Parietaria judaica* L. (obična vijošnica)

Višegodišnja biljka, visine do 40 cm (*Slika 2.4.*). Rizom je kratak i krtolast. Stabljika je polegla ili ustajuća i razgranata. List je dug 2-3(5) cm, sa dugačkom drškom. Liska je jajasta, na osnovi zaobljena ili klinasta a na vrhu ušiljena dok je na obodu cela. Cvast je kraća od lisne drške a brakteje su srasle pri osnovi. Plod je dug oko 1 mm, maslinastozelen i okružen je listićima cvetnog omotača (Tatić i Petković, 2012; Ball, 1996).

Stanište - raste u pukotinama zidova kuća, bedemima, suhozidima, kao i na nitrifikovanim kamenitim mestima u naseljima i pored puteva (Tatić i Petković, 2012).

2.1.3.3. *Parietaria lusitanica* L. subsp. *lusitanica* (portugalska vijošnica)

Jednogodišnja biljka, visine 5-30 cm (*Slika 2.5.*). Koren je tanak i žiličast. Stabljika je razgranata od osnove a grane su tanke, ustajuće i rasute. List je dug do 4 cm, gusto maljav, sa drškom znatno kraćom od liske. Liska je široko jajasta do jajasto okrugla, na osnovi je zaobljena ili kratko klinasta a na vrhu kratko ušiljena ili skoro tupa dok je na obodu cela. Braakteje su iste dužine kao cvetni omotač, ili duže. Cvetni omotač je dug 1,5 mm, listići na vrhu su savijeni i ostaju na plodu. Plod je dug oko 1 mm, široko jajast, na vrhu zatupast, braon ili maslinastozelen i okružen je listićima cvetnog omotača čiji su vrhovi sklopljeni iznad vrha ploda (Tatić i Petković, 2012; Ball, 1996).

Ovaj izuzetno vredan takson za floru Srbije prisutan je samo na jednom lokalitetu u Severoistočnoj Srbiji. Radi se o predstavniku grupe mediterasnko-submediterasnkih taksona koji doprinose ovakvom karakteru flore Srbije. Pored toga ovo nalazište je izolovano od većeg dela areala i predstavlja eksklavu kao i najseverniju tačku rasprostranjenja taksona. Zbog svog taksonomskog statusa, fitogeografske značajnosti, ali i zbog pretećih faktora ugrožavanja, ovaj takson je uvršten u Crvenu knjigu Vaskularne flore Srbije u kategoriji taksona sa malim arealima i sa jednom ili malim brojem populacija (Niketić i Tomović, 1999).

Stanište - raste u pukotinama krečnjačkih stena, u potkapinama i polupećinama; u mediteranskom delu areala, uglavnom u nižim predelima do 700 m n.v., i na senovitim zidinama (Tatić i Petković, 2012).

2.1.3.4. *Parietaria serbica* Pančić (srpska vijošnica)

Za ovu vrstu se koristi i naziv: *Parietaria lusitanica* subsp. *serbica* (Pančić) P.W.Ball. Jednogodišnja je biljka, visine 5-20 cm. Koren je tanak i končast. Stabljika je uspravna ili polegla i razgranata. Lisna drška je iste dužine kao liska, ili duža. Liska je duga (1)2-4 cm, deltoidna ili široko jajasta, na osnovi ponekad kratko usko klinasta a na obodu cela. Gornji listovi su znatno krupniji. Listići cvetnog omotača su iste dužine kao plod. Plod je jajast, na vrhu kratko simetrično ušiljen, crn i sjajan (Tatić i Petković, 2012; Ball, 1996).

Ova vrsta predstavlja subendemičan takson rasprostranjen lokalizovano u Srbiji i Bugarskoj i južnim obroncima Karpata. Na području Srbije je strogo lokalizovana i strogo specifična u odabiru staništa - raste u pukotinama krečnjačkih stena, u potkapinama i oko otvora pećina (Tatić i Petković, 2012).

2.2. HEMIJSKI SASTAV ISPITIVANIH VRSTA

Fitohemijska ispitivanja vrsta rodova *Urtica* i *Parietaria* su veoma oskudna. Jedini izuzetak je, svakako najpoznatiji predstavnik Urticaceae familije, vrsta *Urtica dioica*, o čijem hemijskom sastavu je objavljen značajan broj publikacija. Primenom hromatografije na koloni kao i strukturnih instrumentalnih tehnika - $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ i MS, identifikovana su jedinjenja koja pretežno spadaju u grupe: fenolnih kiselina i njihovih derivata, flavonoidnih glikozida, antocijana, lignana, polisaharida i izoprenoida (pojedinačne komponente i literaturni izvori dati su u *Tabelama 2.1. i 2.2.*).

Tabela 2.1. Jedinjenja do sada identifikovana u ekstraktima nadzemnih delova vrste *Urtica dioica* L.

Grupa jedinjenja	Jedinjenje	Referenca
Fenolne kiseline i njihovi derivati	5- <i>O</i> -kafeoilhinska kiselina	
	kafena kiselina	Budzianowski, (1991);
	ferulna kiselina	Kavtaradze i sar. (2001);
	kafeoil-jabučna kiselina	Exarchou i sar. (2006);
	kafeoilvinska kiselina	Bucar i sar. (2006);
	<i>p</i> -kumarinska kiselina	Grevsen i sar. (2008);
	<i>p</i> -kumaroilhinska kiselina	Pinelli i sar. (2008);
	gentizinska kiselina	Nencu i sar. (2012);
	feruloilhinska kiselina	Farag i sar. (2013)
Flavonoidi i njihovi glikozidi	kvercetin	
	izokvercetin (kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid)	
	4'-metoksi izokvercetin	
	rutin (kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid)	Chaurasia i Wichtl, (1987a);
	kemferol-3- <i>O</i> -glukozid	Kavtaradze i sar. (2001);
	kemferol-3- <i>O</i> -rutinozid	Kavtaradze i Alaniya. (2003);
	izoramnetin-3- <i>O</i> -glukozid	Exarchou i sar. (2006);
	izoramnetin-3- <i>O</i> -rutinozid	Bucar i sar. (2006);
	izoramnetin-3- <i>O</i> -neohesperidozid	Pinelli i sar. (2008);
	kvercetin, luteolin, kemferol*	Grevsen i sar. (2008);
	pelargonidin-ksilozid	Nencu i sar. (2012);
pelargonidin-ksilobiozid	Farag i sar. (2013)	
	peonidin-3- <i>O</i> -rutinozid	
	rosinidin-3- <i>O</i> -rutinozid	
Polisaharidi	RP1 (Mr = 15000) - osnovna struktura	
	1,4- α -glukana sa 1,6- α -grananjem	
	RP2 (Mr = 15000) - kao i RP1 sa niskim	
	sadržajem glukuronske kiseline	
	RP3 (Mr = 200000) i RP4 (Mr = 18000) –	Willer i Wagner, (1990)
	kiseli ramnogalakturonani sa	
	arabinogalaktanskim bočnim nizovima	
	RP5 (Mr = 70000) - arabinogalaktan sa	
	visokim sadržajem glukuronske kiseline	
Karotenoidi	β -karoten, hidroksi- α -karoten, luteoksantin	
	lutein epoksid, violaksantin, neoksantin,	Kudritsata i sar. (1986);
	lutein, likopen	Guil-Guerreroa i sar. (2003)
Masne kiseline	Palmitinska, palmitoleinska, stearinska,	
	oleinska, linolna, linolenska	Guil-Guerreroa i sar. (2003)
Lektini	UDA (= <i>Urtica dioica</i> agglutinin)	Willer i Wagner, (1990)

* aglikoni identifikovani nakon kisele hidrolize

Tabela 2.2. Jedinjenja do sada identifikovana u ekstraktima korena vrste *Urtica dioica* L.

Grupa jedinjenja	Jedinjenje	Referenca
Lignani	neoolivil	
	sekoizolaricirezinol	Kraus i Spiteller, (1990a); Gansser i Spiteller, (1995a);
	izolaricirezinol	Schottner i sar. (1997a);
	pinorezinol	Schottner i sar. (1997b);
	dehidrokoniferil alkohol	Farag i sar. (2013)
Izoprenoidi (steroli)	3,4-divanililtetrahidrofuran	
	pinen-dioli i pinen-diol glikozidi	
	β -sitosterol, β -sitosterol-glukozid,	
	7 α -hidroksi-sitosterol, 7 β -hidroksi-sitosterol,	Chaurasia i Wichtl, (1987b);
	(6'- <i>O</i> -palmitoil)-sitosterol-3- <i>O</i> -glukozid,	Kraus i Spiteller, (1990b);
	7 α -hidroksi-sitosterol-glukozid	Gansser i Spiteller, (1995a);
	7 β -hidroksi-sitosterol-glukozid	Daniel i Wichtl, (1997);
oleanolinska i urzolinska kiselina	Farag i sar. (2013)	
14-oktakosanol		
(9Z,11E)-13-hidroksi-9,11-oktadekadienska kis		

Iz sumiranih rezultata dosadašnjih publikacija navedenih u tabelama 2.1. i 2.2. može se zaključiti da se hemijski sastav nadzemnog dela biljke i korena drastično razlikuje. U nadzemnim delovima dominiraju fenolne kiseline i njihovi derivati kao i glikozidi flavonoida dok su u korenu zastupljeni isključivo lignani i manje polarna jedinjenja steroidnih struktura što je i karakteristična distribucija sekundarnih biomolekula u biljkama.

Hemijski sastav druge vrste iz roda *Urtica* ispitivane u ovom radu – *U. kiviensis* – do sada nije ispitivan tako da rezultati predstavljeni u kasnijim poglavljima 4.3. i 4.4. pružaju jedinstvene informacije o sekundarnim biomolekulima u ovoj vrsti.

Slično tome, veoma se malo zna o hemijskom sastavu vrsta iz roda *Parietaria* – *P. lusitanica*, *P. judaica*, *P. serbica*. Jedina vrsta iz roda *Parietaria* čiji je hemijski sastav donekle ispitan jeste vrsta *P. officinalis*. U metanolnim ekstraktima cveta i lista ove biljke identifikovane su kafeoil-jabučna i dve pirolne kiseline: 1*H*-pirol-2,3-dikarboksilna i 1-[(kafeoiloksi)(karboksi)metoksi]-1*H*-pirol-2,3,5-trikarboksilna kiselina; kao i sledeći flavonoidni glikozidi: 3-*O*-glukozidi i 3-*O*-rutinozidi kvercetina, kemferola i izoramnetina; 3-*O*-soforozidi kvercetina i kemferola i 3-*O*-neohesperidozidi kemferola i izoramnetina (Budzianowsky i sar, 1985; Budzianowsky, 1990).

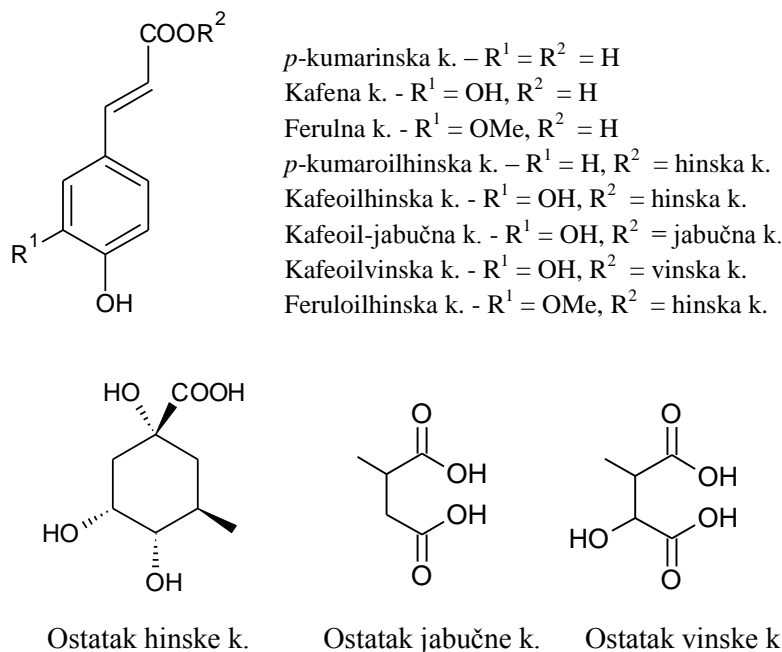
S obzirom da je u ovom radu dat akcenat na identifikaciji biljnih fenola kao sekundarnih biomolekula, potencijalnih nosilaca biološke aktivnosti, u narednim podpoglavljima biće dat kratak pregled funkcije, biosinteze i biološke aktivnosti dominantnih jedinjenja iz grupa fenolnih kiselina, flavonoidnih glikozida i lignana.

2.2.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline predstavljaju najjednostavnije biljne fenole i obuhvataju hidroksibenzojeve kiseline (C₆-C₁) koje se često i zovu fenolne kiseline i fenilpropenske kiseline (C₆-C₃). Jedinjenja iz ove grupe su veoma rasprostranjena u biljnom svetu, gotovo univerzalno, i smatra se da su ove komponente (pored drugih) zaslužne za odbranu biljke od različitih patogena i štetnih uticaja iz spoljašnje sredine. Kako su konstitutivno prisutne u biljkama, čine deo pasivne odbrane biljke tj kao fitoanticipini (eng. *phytoanticipins*) štite biljku od veoma velikog broja gljivica i bakterija ali pri tom nemaju izraženo toksično dejstvo na njih (Vermerris i Nicholson, 2006). Osim što imaju važnu ulogu u biljkama koje ih

sintetišu, takođe je poznato blagotvorno dejstvo fenolnih kiselina na ljudski organizam jer ispoljavaju antioksidantno, antiviralno antiinflamatorno i hepatoprotektivno dejstvo.

U ispitivanim vrstama, zastupljene su pretežno fenilpropenske kiseline i to u slobodnom ali i obliku međusobnih derivata (Slika 2.6.). Kafena, ferulna i *p*-kumarinska kiselina su prisutne kako slobodne tako i u formi derivata - estara sa hinskom, jabučnom i vinskom kiselinom. Dominantno jedinjenje ove iz grupe biljnih fenola predstavlja upravo derivat kafene kiseline - tj. njen estar sa hinskom kiselinom: 5-*O*-kafeoilhinska kiselina.



Slika 2.6. Strukture fenolnih kiselina i njihovih derivata nađenih u vrsti *U. dioica*.

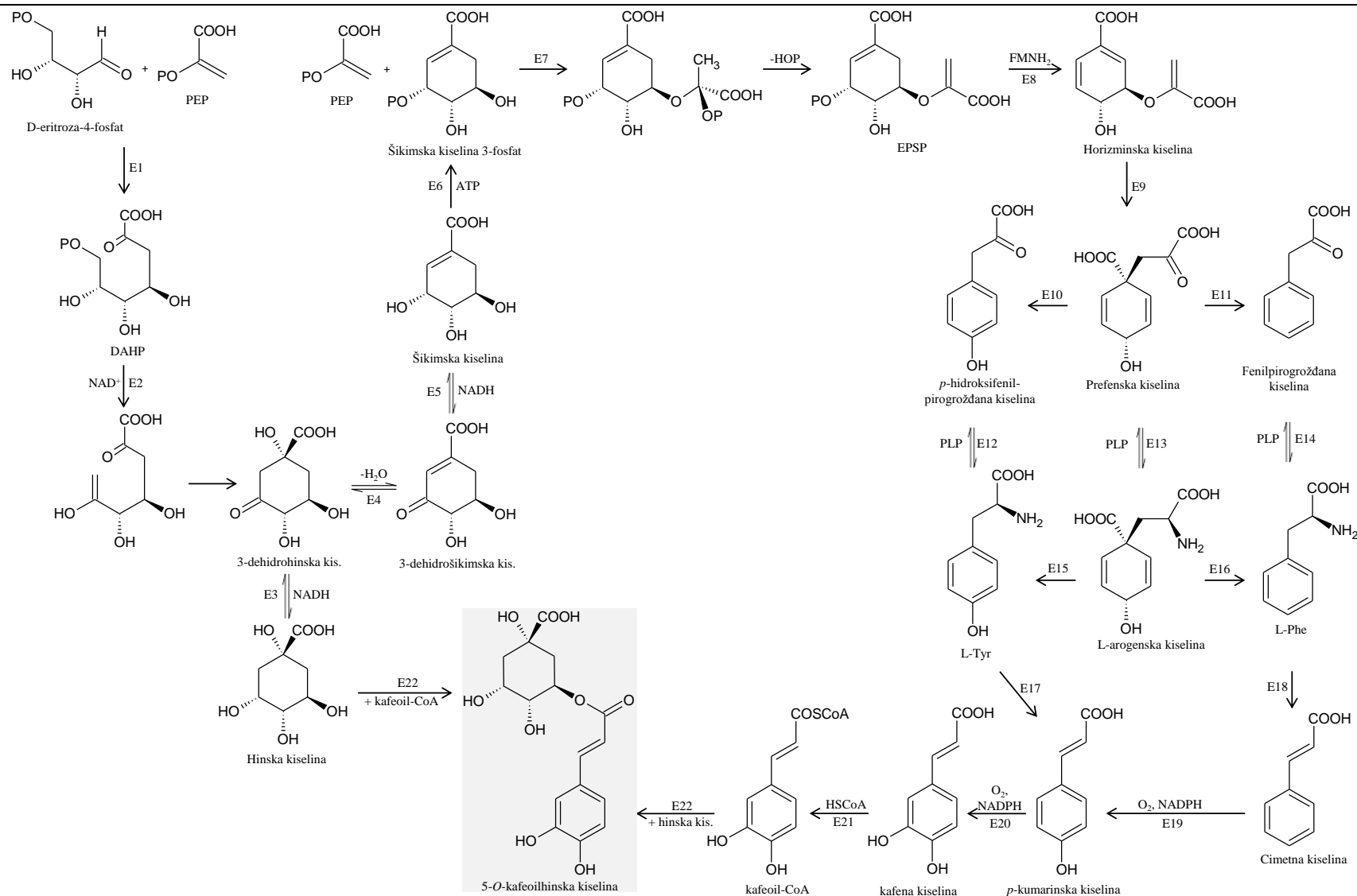
Hlorogenska (5-*O*-kafeoilhinska kiselina), kafena i hinska kiselina

Naziv - hlorogenska kiselina - se danas uglavnom odnosi na familiju estara hinske kiseline i mono-estri kafene (CQA), *p*-kumarinske (pCoQA) i ferulne kiseline (FQA); di-, tri- i tetra-estri kafene kiseline (C₂QA, C₃QA i C₄QA); mešoviti di-estri kafene i ferulne kiseline (CFQA) ili kafene i sinapinske kiseline (CSiQA). Najzastupljenija i komercijalno najdostupnija hlorogenska kiselina je ona koja se po preporukama IUPAC nomenklature naziva 5-*O*-kafeoilhinska kiselina (5-CQA). Zbog toga se često i naziv hlorogenska kiselina odnosi upravo na ovo jedinjenje ali se označava i kao 3-CQA (po nomenklaturi pre IUPAC) što treba izbegavati. (Clifford, 2000).

Uloga ove komponente u biljkama jeste da ih štiti od patogena i biljnih štetočina iako pri tom ne ispoljava izrazito toksično dejstvo. Jedan od mehanizama kojim ova komponenta ispoljava toksično dejstvo je ispitivan je na primeru odbrane od štetočina kao što su crvi *Heliothis zea* i *Spodoptera exigua* koji se hrane plodom paradajza (*Lycopersicon esculentum*). Nakon što je hlorogenska kiselina dospela u organizam štetočina, polofenol oksidaze je konvertuju u toksični hlorogenohinon koji reaguje sa -SH i -NH₂ grupama na proteinima. Dolazi do unakrskog vezivanja proteina i hlorogenske kiseline što narušava funkciju proteina i smanjuje aminokiselinski pool samog insekta (Felton i sar. 1989).

Biosinteza

Biosintetsko poreklo 5-*O*-kafeoilhinske kiseline je iz šikimatnog puta u kojem se gradivne jedinice iz primarnog metabolizma - D-eritroza-4-fosfat i fosfoenolpiruvat - kupluju do D-arabino-heptulozonske



Slika 2.6. Biosinteza 5-O-kafeoilhinske kiseline. (E1 – DAHP sintaza, E2 – 3-dehidrohinat sintaza, E3 – hinat dehidrogenaza, E4 – 3-dehidrohinat dehidrataza, E5 – šikimat dehidrogenaza, E6 – šikimat kinaza, E7 – EPSP sintaza, E8 – horizmat sintaza, E9 – horizmat mutaza, E10 – prefenat dehidrogenaza, E11 – prefenat dehidrataza, E12 – 4-hidroksipiruvat aminotransferaza, E13 – prefenat aminotransferaza, E14 – fenilpiruvat aminotransferaza, E15 – arogenat dehidrogenaza, E16 – arogenat dehidrataza, E17 – tirozin-amonijak lijaza, E18 – fenilalanin-amonijak lijaza, E19 – cinamat 4-hidroksilaza, E20 - *p*-kumarat 3-hidroksilaza, E21 – 4-kumarat:CoA ligaza, E22 – hinat *O*-hidroksicinamoil transferaza) (Dewick, 2009)

kiseline-7-fosfata, što predstavlja početnu reakciju ovog biosintetskog puta (*Slika 2.6.*). Serijom reakcija koje uključuju NAD^+ -zavisnu oksidaciju 4-OH, eliminaciju fosforne kiseline, redukciju 4-okso grupe i aldolnu reakciju, nastaje 3-dehidrohinska kiselina koja se redukuje do hinske kiseline koja predstavlja prvu komponentu 5-*O*-kafeoilhinske kiseline. Biosinteza druge komponente, kafene kiseline, se nastavlja dehidratacijom i redukcijom 3-dehidrohinske kiseline u šikimi kiselinu. Daljom konverzijom, preko šikimat-3-fosfata i 5-enolpiruvil-šikimat-3-fosfata (EPSP) kao intermedijera, nastaje horizminka kiselina. Naredna faza u biosintezi podrazumeva prevođenje horizminske kiseline do C6-C3 metabolita - aromatičnih aminokiselina L-fenilalanina i L-tirozina. I na kraju, eliminacijom amonijaka dolazi do formiranja cimernih kiselina. Nastanak *p*-kumarinske kiseline moguć je direktnom deaminacijom L-tirozina ili hidroksilacijom cimretne kiseline, što je češća reakcija. Sledi hidroksilacija *p*-kumarinske kiseline do kafene, njeno prevođenje u aktiviran oblik - kumaroil-CoA koji će reagovati sa hinskom kiselinom dejstvom enzima hinat *O*-hidroksicinamoil transferaze dajući 5-*O*-kafeoilhinsku kiselinu (Dewick, 2009).

Apsorpcija i metabolizam

Nakon oralnog unošenja kafene i hlorogenske kiseline u organizam, svega 19,5 % kafene a 8 % hlorogenske kiseline dospe u perifernu cirkulaciju. U lumenu creva, dejstvom esteraze, hlorogenska kiselina se prevodi u kafenu, a u manjoj meri kafena u ferulnu kiselinu. Glavno mesto hidrolize i apsorpcije hlorogenske kiseline je tek u kolonu, gde se takođe vrši hidroliza ali dejstvom esteraza intestinalne mikroflore. Iz periferne krvi, ove fenolne kiseline dospevaju u jetru, gde se mali deo ekskretuje preko žuči u nepromenjenoj ili *O*-metilovanoj formi (Lafay i sar. 2006). Ekskrecija hlorogenske i kafene kiseline iz organizma se vrši putem urina u toku prva 4 sata nakon oralne administracije. Iz organizma se izlučuju u neizmenjenoj formi ali i u obliku vanilinske, ferulne i izoferulne kiseline. Metilacije se vrše u jetri pomoću enzima katehol-*O*-metiltransferaze i ovi metilovani derivati se ekskretuju preko žuči mnogo više nego sama kafena kiselina (Jacobson i sar. 1983; Cremin i sar. 2001).

Biološka aktivnost

Antioksidantna aktivnost - hlorogenska i kafena kiselina ispoljavaju antoksidantni efekat neutrališući slobodne radikale u nekoliko *in vitro* sistema (Nardini i sar, 1995; Ohnishi i sar, 1994; Laranjinha i Cadenas, 1999; Foley i sar, 1999). *In vivo*, nakon oralnog unosa ove dve kiseline, u ljudskom organizmu dolazi do povećanja antioksidantnog kapaciteta plazme, koncentracije endogenih antioksidanata (vitamina E) i *ex vivo* rezistencije lipoproteina na oksidaciju (Nardini i sar, 1997; Natella i sar. 2002; Lafay i sar. 2005)

Antiviralna aktivnost - u eksperimentu na ćelijskim linijama, obe kiseline inhibiraju replikaciju DNA kod hepatitis B virusa, kao i produkciju HBsAg (hepatitis B virus antigen) dok kod eksperimentalnih životinja smanjuju serumski DHBV (eng. duck hepatitis B virus) (Wang i sar. 2009).

Antikancerogena aktivnost - prema istraživanju Tanaka i Mori-ja (1995) dokazano je da su zamorčići čija je hrana bila obogaćena kafenom kiselinom i 5-CQA bili manje podložni delovanju metilazoksimetanola (inicijator karcinoma kolona) i 4-nitrohinolin-1-oksida (induktora neoplazme jezika).

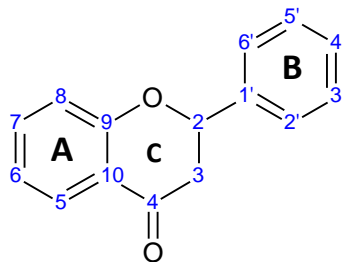
Hipolipidemična aktivnost - smatra se da 1,3-diCQA, odnosno, cinarin iz ekstrakta artičoke ima blago hipoholesterolemično delovanje, mada, nije utvrđen mehanizam delovanja (Clifford i Walker, 1985). Međutim, ako se sve hlorogenske kiseline metabolišu na slične načine, postavlja se pitanje zašto i kafa kao napitak koji sadrži značajne količine ovih kiselina ne ispoljava slično dejstvo. Pretpostavka je da hipoholesterolemični efekat CQA iz kafe maskiran hiperholesterolemičnim efektom diterpena prisutnim u ovom napitku (Ito i sar, 1995; Katan i Urgert, 1995). Prema istraživanju Cho i sar. (2010) utvrđeno je da

obe kiseline povećavaju sagorevanje lipida kod miševa aktivacijom β -oksidaze, dovode do smanjenja njihove telesne težine i nivoa hormona zaslužnih za biosintezu lipida kao što su leptin i insulin. Smanjuju nivo triglicerida (u plazmi, jetri i srcu) i holesterola (u plazmi, adipoznom tkivu i srcu). Kafena i hlorogenska kiselina smanjuju aktivnosti sintaze masnih kiselina, 3-hidroksi-3-metoksiglutaryl CoA reduktaze i acil-CoA:holesterol aciltransferaze, na taj način poboljšavajući lipidni status miševa uprkos mastima bogatoj ishrani.

2.2.2. Flavonoidi i njihovi glikozidi

Flavonoidi (C6-C3-C6) predstavljaju najbrojniju i najdivergentniju grupu biljnih fenola, i svakako su predstavljaju jedne od najinteresantnijih sekundarnih biomolekula u modernim istraživanjima. Pripisuju im se brojne uloge u razvoju i razmnožavanju biljaka kao što su uloga u privlačenju insekata i širenju semena, stimulacija bakterija u fiksaciji azota i u resorpciji mineralnih nutrijenata. Imaju važnu funkciju u zaštiti biljaka od štetnih abiotičkih uticaja (npr. UV zračenje, ekstremne temperature, suša), od raznih herbivora i patogenih i predstavljaju glavne komponente biljaka zadužene za alelopatske interakcije sa okolnim vrstama. Neki predstavljaju pigmente biljaka pa daju crvene, plave i žute nijanse cvetovima. Zbog svega nabrojanog, može se zaključiti da su flavonoidi od izuzetnog značaja za normalan rast i razvoj biljaka. Zbog svega nabrojanog nije iznenađujuće što su flavonoidi veoma zastupljeni u biljnom svetu i što sam biljni organizam troši značajnu količinu metaboličke energije za njihovu biosintezu (Gould i Lister, 2006).

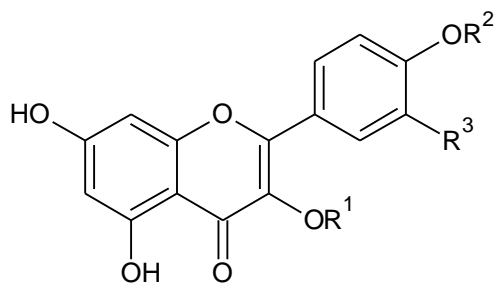
Flavonoidi su derivati 2-fenil-1,4-benzopirona, prikazanog na *Slici 2.7*. Kao veoma divergentna grupa, flavonoidi se dele na nekoliko klasa: flavoni, flavonoli, flavanoni, dihidroflavonoli, leukoantocijanidini, flavan-3-oli (katehini), antocijanidini i izoflavoni. Najrasprostranjenije klase su flavonoli, flavoni i flavan-3-oli. Flavonoidi su u biljkama zastupljeni uglavnom u obliku *O*-glikozida (osim katehina) i to u položaju 3 i nešto ređe 7, dok su hidroksilne grupe u B prstenu retko mesto vezivanja šećerne komponente. Pored *O*-glikozida, postoje i *C*-glikozidi, gde je šećerna komponenta vezana direktno za C-atom osnovnog skeleta flavonoida (položaji 6 i 8) ali su oni znatno manje zastupljeni. Od šećera najčešće u sastav glikozida ulaze glukoza, a za njim slede galaktoza, ramnoza, arabinoza od monosaharida a rutinoza se najčešće javlja kao disaharid (Hollman i Arts, 2000)



Slika 2.7. Struktura i numeracija 2-fenil-1,4-benzopirona (osnovni skelet flavonoida).

Flavonoidi predstavljaju glavne sekundarne biomolekule u ishrani koja je bazirana na hrani biljnog porekla. S obzirom da su u velikoj količini prisutni u biljkama, procenjeno je da se oko 3-80 mg flavonoida dnevno unese u organizam ishranom. Zbog toga je veoma značajno ispitati uticaj flavonoida na ljudski organizam i iskoristiti njihovo eventualno blagotvorno dejstvo (Hertog i sar, 1995; Rimm i sar, 1996). Flavonoidi ispoljavaju brojne pozitivne efekte na ljudski organizam od kojih su najvažnije: antooksidantni, hepatoprotektivni, kardioprotektivni, antibakterijski, antiviralni, anti-inflamatorni i antikancer efekat (Narayana i sar, 2001; Kumar i Pandey, 2013)

U vrstama ispitivanim u ovom radu, do sada je identifikovano nekoliko glikozida flavonoida, pretežno flavonola - kemferol, kvercetin i izoramnetin glukozidi i rutinozidi dok slobodni aglikoni nisu detektovani (Slika 2.8.). Od glikozida antocijana nađeni su pelargonidin ksilozid i ksilobiozid i rutinozidi peonidina i rosidina. Od pomenutih glikozida, kao dominantno jedinjenje se izdvoio rutin - kvercetin-3-O-rutinozid.



Kvercetin - $R^1=R^2=H, R^3=OH$

Izokvercetin - $R^1=glc, R^2=H, R^3=OH$

4'-metoksi izokvercetin - $R^1=Glc, R^2=CH_3, R^3=OH$

Rutin - $R^1=rut, R^2=H, R^3=OH$

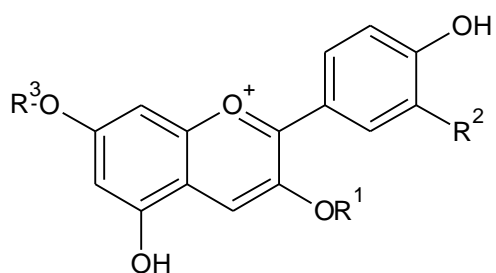
Kemferol-3-O-glukozid - $R^1=glc, R^2=R^3=H$

Kemferol-3-O-rutinozid - $R^1=rut, R^2=R^3=H$

Izoramnetin-3-O-glukozid - $R^1=glc, R^2=H, R^3=OCH_3$

Izoramnetin-3-O-rutinozid - $R^1=rut, R^2=H, R^3=OCH_3$

Izoramnetin-3-O-neohesperidozid - $R^1=neo, R^2=H, R^3=OCH_3$



Pelargonidin - $R^1=R^2=R^3=H$ (ksilozid i ksilobiozid)

Peonidin-3-O-rutinozid - $R^1=rut, R^2=OCH_3, R^3=H$

Rosinidin-3-O-rutinozid - $R^1=rut, R^2=R^3=OCH_3$

Slika 2.8. Strukture flavonoidnih i antocijanidnih glikozida nađenih u vrsti *U. dioica*.

Rutin (kvercetin-3-O-rutinozid)

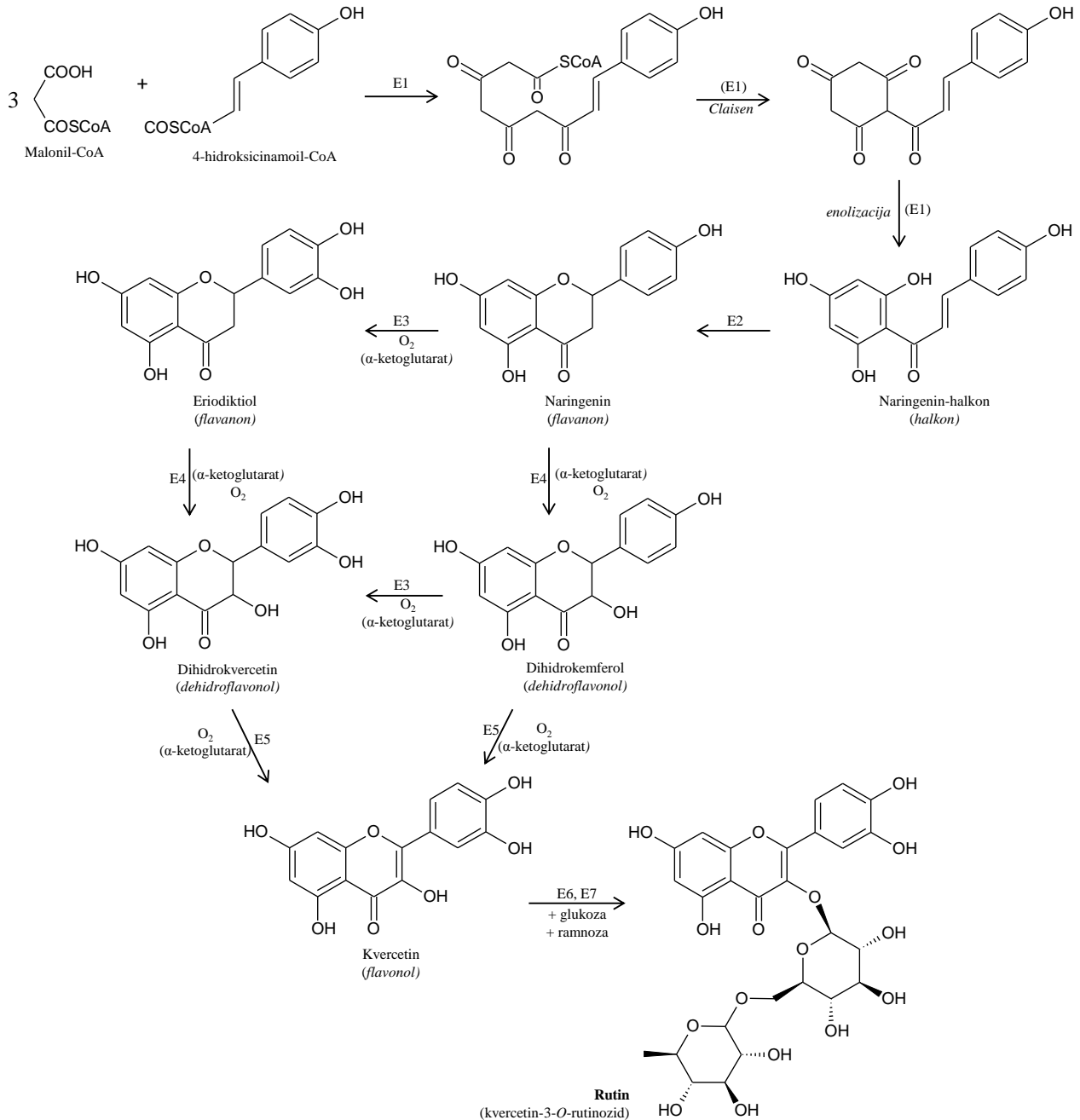
Rutin je, kao i većina flavonoidnih glikozida, locirana u nadzemnim delovima biljaka (Suzuki i sar, 2005). Primećeno je da se koncentracija rutina brzo povećava nakon izlaganja biljke UV-B zračenju. Ovo ukazuje da rutin ima značajnu ulogu u zaštiti biljke od UV zračenja (Harborne i Williams, 2000). Kada je biljka izložena stresu, dolazi do povećanja aktivnosti peroksidaza kao što je rutin glukozidaza (flavonol-3-glukozidaza) koja vrši hidrolizu rutina do aglikona kvercetina i disaharida rutinoze. Kvercetin dalje služi kao supstrat gvajakol peroksidaze i štiti biljku od kiseoničnih radikala, a rutinoza - disaharid, služi kao dodatan izvor energije za biljku (Amako i sar, 1994).

Rutin je, zbog svoje široke rasprostranjenosti u biljnom svetu, važan sastojak u ishrani koja je bazirana na hrani biljnog porekla. Pored toga, zbog svojih brojnih bioloških aktivnosti se nalazi u sastavu preko 130 medicinskih preparata (Reynolds, 1996). Zajedno sa rutinom, obično je prisutan i njegov aglikon - kvercetin, i zastupljeni su u namirnicama kao što su luk, jabuke, bobičasto voće, čaj i vino (Manach i sar, 1997). Rutin ima veliki potencijal kao fitohemijski sastojak dijetetskih suplemenata zbog svojih brojnih farmakoloških aktivnosti i blagotvornog dejstva na ljudski organizam.

Biosinteza

Rutin, odnosno, njegov aglikon kvercetin je mešovitog biosintetskog porekla (Slika 2.8.), kao i svi flavonoidi - A prsten nastaje poliacetatnim putem tj. ugradnjom C2 jedinica iz malonil-CoA, a prsten B podiće od tioestara CoA i fenilpropanskih kiselina (nastalih u šikimatnom putu). Prva reakcija podrazumeva nastanak poliketidnog niza iz tri molekula malonil-CoA nadovezanih na 4-hidroksicinamoil-CoA. U Claisen-ovoj reakciji se zatvara prsten i nakon enolizacije nastaje aromatični A prsten sa klasičnim rasporedom hidroksilnih grupa za poliketide - meta-supstitucija na pozicijama 5 i 7. Nastali halkan je

prekursor za sve klase flavonoida i dejstvom halkan izomeraze, zatvara se i C prsten pri čemu nastaje flavanon naringenin. Sukcesivnim hidroksilacijama u položajima 3 i 3' nastaju dehidroflavonoli, koji dalje, uvođenjem dvostruke veze u položaju C2-C3 daju kvercetin. Konačno, adicijom molekula glukoze i ramnoze nastaje rutin (Winkel-Shirley, 2001).



Slika 2.8. Biosinteza rutina (kvercetin-3-*O*-ramnozida).

(E1 – halkan sintaza, E2 – halkan izomeraza, E3 – flavanon-3'-hidroksilaza, E4 - flavanon-3-hidroksilaza, E5 – flavonol sintaza, E6 – UDPG flavonoid glukozil transferaza, E7 – ramnozil transferaza) (Winkel-Shirley, 2001).

Apsorpcija i metabolizam

Generalno, flavonoidni glikozidi u digestivnom traktu podležu hidrolizi pod dejstvom crevne mikroflore, do aglikona i šećerne komponente (Kuhnau, 1976). Prema tome, rutin se sporije apsorbuje od svog aglikona kvercetin, jer je on, kao aglikon, odmah dostupan za apsorpciju (Manach i sar, 1997). Međutim, kod pacijenata sa ileostomijom primećeno je da se rutin iz luka brže apsorbuje od svog aglikona (Hollman i sar, 1995). Gotovo da se ni malo rutina ne apsorbuje u neizmenjenom obliku, jer se dejstvom crevne flore degradira ne nekoliko manjih metabolita. Dominantna je reakcija hidrolize šećerne komponente enzimima α -ramnozidaza i β -glukozidaza (Bokkenheuser i sar, 1987; Manach i sar, 1995). Metaboliti koji nastaju su: kvercetin (u najvećoj meri) a zatim izokvercetin i fenolni derivati: 3,4-dihidroksifenilsirćetna kiselina (3,4-DHPAA), 3,4-dihidroksitoluen (3,4-DHT), 3-hidroksifenilsirćetna kiselina (3-HPAA) i homovanilinska kiselina (HVA) (Griffits i Barrow, 1972; Baba i sar, 1981; Winter i sar, 1989; Schneider i sar, 2000). Oko 80 % kvercetin koji cirkuliše u plazmi, prisutan je kao njegov metoksi derivat (izoramnetin) ili u obliku konjugovanih derivata. Do konjugacije i metilacije dolazi u jetri i vrši se na slobodnim OH grupama B prstena kao i pozicijama 3 i 5, u cilju smanjivanja reaktivnosti kvercetin (Manach i sar, 1997). Metaboliti rutina, naročito kvercetin, 3,4-DHPAA i 3,4-DHT sadrže vicinalne hidroksilne grupe koje mogu sprečiti oksidacije i vrše helatiranje jona gvožđa i bakra te na taj način smanjuju produkciju slobodnih radikala (Cervantes-Laurean i sar, 2006). Rutin se ekskretuje iz organizma putem urina i to u obliku manjih metabolita kao što su: 3-HPAA, HVA, 3,4-DHPAA i 3,4-DHT, nastalih dejstvom enzima kolonske mikroflore koji cepaju C-C veze osnovnog skeleta rutina (Baba i sar, 1981).

Biološka aktivnost

Antioksidantna aktivnost - rutina je dokazana brojnim testovima u kojima je pokazao sposobnost neutralizacije sledećih radikalskih vrsta: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), N,N-dimetil-p-fenilendiamin (DMPD), superoksid anjon i hidroksid radikala. Zatim u testovima helatiranja metala i sposobnosti da redukuje gvožđe (FRAP test) (Gulpinar i sar, 2012). Smanjuje ishemijsku neuralnu apoptozu smanjujući ekspresiju p53 proteina, sprečava morfološke promene i smanjuje aktivnost enzima čijim dejstvom nastaju slobodni radikali (Khan i sar, 2009). Mehanizam antioksidantnog delovanja rutina se ogleda u njegovoj sposobnosti da donira elektron slobono-radikalskim česticama, konvertujući ih u stabilne strukture, i omogućena mu je usled prisustva velikog broja slobodnih fenolnih grupa u strukturi (Yang i sar, 2008)

Uticaj na imuni odgovor - u *in vitro* i *in vivo* uslovima smanjuje produkciju NO u makrofagama, nakon stimulacije inflamatornog odgovora lipopolisaharidima (Shen i sar, 2002). Pozitivno je to što rutin pri dozi od 20 mg/mL inhibira za 92 % produkciju NO iz makrofaga a da pri tom ne uništava same ćelije makrofaga (Han, 2009). Ovaj mehanizam dejstva je dvostruko pozitivan i primenljiv u tretmanu artritisa jer većina lekova za artritis samnjuje inflamaciju tako što potpuno uništava makrofage i na taj način ipak slabi odbranu organizma. S toga, ovakvo anti-inflamatorno delovanje rutina je primenljivo u tretmanima reumatoidnog artritisa i osteoartritisa (Umar i sar, 2012). Rutin inhibira transkripciju više od 20 gena koje kodiraju proinflamatorne faktore kao što su: TNF- α , IL-1, IL-8 (Krauss i sar, 2008). Štiti integritet vaskularne barijere inhibirajući: hiperpermeabilnost krvnih sudova, ekspresiju adhezivnih molekula, adheziju i migraciju leukocita i na taj način smanjuje procese inflamacije u krvnim sudovima (Lee i sar, 2012)

Anti-dijabetsko dejstvo - rutin ispoljava blagotvorno dejstvo kod *Diabetes mellitus*-a na tri nivoa: ubrzava homeostazu glukoze, sprečava nastanak AGEs (eng. advanced glycation end products) i sprečava dijabetsku nefropatiju. Rutin reguliše homeostazu glukoze tako što dovodi do povećanja sekrecije insulina, povećava sadržaj glikogena u jetri i mišićima a smanjuje u bubrezima, smanjuje koncentraciju glukoze u plazmi povećavajući aktivnost heksokinaze a smanjujući aktivnost glukoza-6-fosfataze i fruktoza-6-

bisfosfataze (Stanley Maizen Prince i Kamalakkannan, 2006). Nakon ishrane bogate rutinom, kod pacova obolelih od dijabetesa, došlo je do smanjenja količine N-fruktoselisina za čak 20 % nakon 4 nedelje (Nagasawa i sar, 2002). Nastajenje AGEs-a smanjuju i metaboliti rutina, naročito oni koji u strukturi zadržavaju vicinalne hidroksilne grupe (Cervantes-Laurean i sar, 2006). Takođe, smanjuje glikozilaciju hemoglobina i na taj način može sprečiti komplikacije koje rezultuju oštećenjem nerava i slepilom (Asgary i sar, 1999). Jedna od komplikacija dijabetesa jeste oštećenje bubrega usled akumulacije hidroksiprolina, laminina i kolagena tipa IV. Rutin povećava aktivnost matriksnih metaloproteinaza u bubrezima i na taj način stimuliše degradaciju nakupljenih ekstracelularnih proteina u bubrezima (Stanley Maizen Prince i Kamalakkannan, 2006).

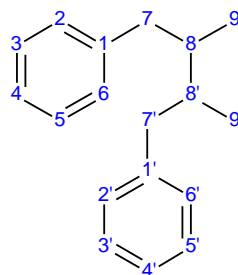
Hipolipidemično dejstvo - smanjuje količinu masnoća i holesterola u krvi, smanjujući nivo VLDL i LDL a povećavajući nivo HDL-a (Kayashita i sar, 1997; Jiang i sar, 2007). Smatra se ra rutin smanjuje rizik od arteroskleroze jer smanjuje oksidaciju LDL čestica i na taj način sprečava najstajanje penastih ćelija (Milde i sar, 2004)

Kardioiprotektivno dejstvo - rutin smanjuje abnormalno propuštanje i oštećenje kapilara kao i vensku insuficijenciju kod kardiovaskularnih bolesti (Hertog i sar, 1995; Rimm i sar, 1996; Annapurna i sar, 2009). Inhibira agregaciju trombocita (anti-PAF efekat) čime može sprečiti pojavu infarkta, plućne embolije ili opstrukcije krvnih sudova (Pace-Asciak, 1995).

Antikancerano dejstvo - rutina inhibira rast nekoliko tumorskih ćelija *in vitro*, smanjuje prekidanje DNA lanca uzrokovano hepatokarcinogenima i smanjenje razvoj neoplazije kolona kod pacova (Deschner i sar, 1991; Webster i sar, 1996; Van der Logt i sar, 2003). Kvercetin vrši inhibiciju topoizomeraze I i II i na taj način štiti DNA i hromosome od oštećenja (Cantero i sar, 2006).

2.2.3. Lignani

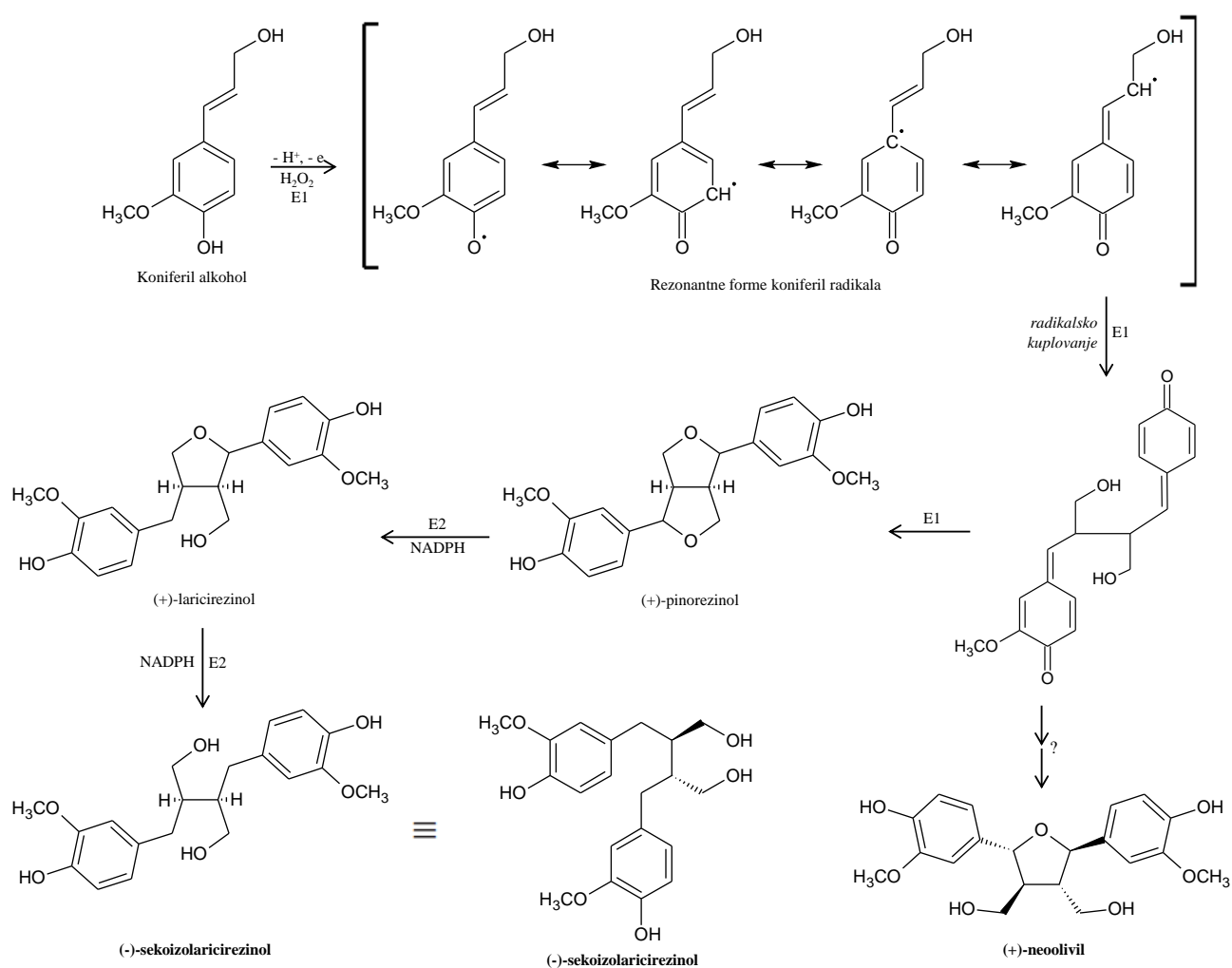
Lignani predstavljaju grupu biljnih fenola koji nastaju β - β' (ili 8-8') kuplovanjem dve C6-C3 (propilbenzenske) jedinice u užem smislu (Slika 2.9.), a u širem smislu se podrazumevaju i jedinjenja nastala kuplovanjem u drugim pozicijama koji su nazvani neolignani. Zbog velikog broja načina vezivanja dva monomera, postoji velika strukturna divergentnost u grupi lignana. U biljkama se lignani, za razliku od flavonoida, uglavnom javljaju slobodni, ređe u obilku glikozida, lokalizovani su uglavnom u stabljikama i u korenu (ili rizomu) i smatra se da imaju ulogu u zaštiti biljke od mikroba, gljivica, insekata i herbivora (Vermerris i Nicholson, 2006). Prisutni su u relativno niskim koncentracijama ali ima slučajeva kod pojedinih drvenastih biljaka koje luče smolu nakon povrede koja može sadržati i do 24 % lignana (Ayres i Loike, 1990).



Slika 2.9. Struktura i numeracija osnovnog skeleta lignana (β - β' – kuplovanje).

Biosinteza

Na slici 2.10. je data biosinteza sekoizolaricirezinola i neoolivila, kao dominantnih lignanskih komponenti u ekstraktu korena vrste *U. dioica*. Najčešći monomeri (monolignoli) u biosintezi lignana su: *p*-kumaroil alkohol, koniferil alkohol i sinapil alkohol, od kojih je koniferil alkohol najzastupljeniji (Vermerris i Nicholson, 2006). Monolignoli nastaju redukcijom odgovarajuće feilpropenske kiseline dejstvom dehidrogenaza. Biosinteza lignana započinje jedoelektronskom oksidacijom monolignola dejstvom peroksidaza, formira se radikal čiji je nesparen elektron delokalizovan preko benzenovog prstena i bočnog niza. Radikaliskim kuplovanjem dva koniferil radikala nastaju hinonmetidi koji podležu intramolekulskoj nukleofilnoj supstituciji formirajući pinorezinol. Otvaranjem furanskih prstenova nastaju laricirezinol i sekoizolaricirezinol (Dewick, 2009). Lignan neoolivil takođe nastaje kuplovanjem dva koniferil radikala ali finalne reakcije njegove biosinteze nisu poznate. Može se pretpostaviti da nakon formiranja hinonmetida dolazi do oksidacije u položaju 7 ili 7' i tek onda nukleofilnog napada i formiranja furanskog prstena.

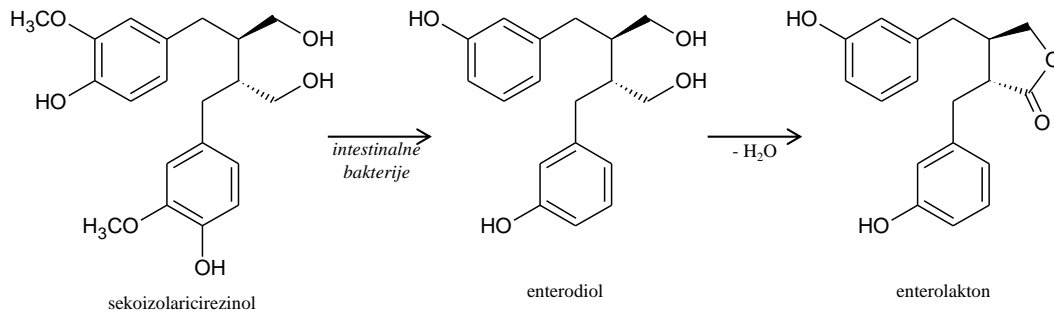


Slika 2.10. Biosinteza lignana (sekoizolaricirezinol i neoolivil) identifikovanih u ekstraktu korena vrste *U. dioica* (E1 – pinorezinol sintaza, E2 – pinorezinol/lariciezinol reduktaza) (Dewick, 2009).

Apsorpcija i metabolizam

Svi lignani uneti ishranom podležu dejstvu crevne mikroflore i na prvom koraku dolazi do hidrolize glikozida na aglikonski i šećerni deo. Sledeći korak predstavlja serija demetilacija i dehidrosilacija nakon kojih nastaju tzv. sisarski lignani ili enterolignani - enterodiol a njegovom

oksidacijom enterolakton (Slika 2.11.). Ovi enterolignani se dalje koguguju u jetri do sulfata i, uglavnom, glukuronata i eliminišu putem urina (Landete, 2012).



Slika 2.11. Konverzija lignana u digestivnom traktu do sisarskih lignana – enterodiola i enterolaktona.

Biolška aktivnost

Zbog velike raznovrsnosti struktura, lignani ispoljavaju brojna farmakološka svojstva od kojih je svakako najznačajnije antikancerogeno dejstvo ali ispoljavaju i kardioprotektivno, antiviralno, anti-inflamatorno, antimikrobno, antioksidantno, imunosupresorno dejstvo.

Antikancerno dejstvo - najpoznatiji predstavnik lignana - podofilotksin - je pre svega značajan po svom citotoksičnom dejstvu tj. sposobnosti da se vezuje za protein tubulin, sprečava njegovu polimerizaciju i formiranje mirkotubula i na taj način zaustavlja ćelijsku deobu. Za interakciju ovog lignana sa tubulinom esencijalno je prisustvo laktonskog i B prstena u njegovoj strukturi, dok većina supstituenata vezana u položaju C7 u B prstenu, značajno smanjuje vezivanje za tubulin. Međutim, pošto podofilotksin ispoljava citotoksično dejstvo jednako i prema zdravim i prema tumorskim ćelijama, ranih 70-tih godina, sintetisani su njegovi semisintetski derivati - etopozid i tenipozid, u cilju smanjenja negativnih efekata samog podofilotoksina. Ova dva semisintetska derivata ulaze u sastav brojnih citostatika koji se primenjuju u terapijama karcinoma testisa, pluća, nekih vrsta leukemije i neuroblastoma (Ayres i Loike, 1990). Ipak, mehanizam njihovog dejstva se razlikuje tj. oni se ne vezuju za tubulin već inhibiraju enzim topoizomerazu II tj. stabilizuju DNA-topo II kompleks i na taj način dovode do razaranja DNA i ćelijske smrti (Lee i Xiao, 2005). Pored podofilotoksina i njegovih semisintetskih derivata, čije je citotoksično delovanje potvrđeno, ispitivano je citotoksično dejstvo i drugih predstavnika divergentne grupe lignana. Utvrđeno je da brojni i strukturno veoma različiti lignan ispoljavaju citotoksično delovanje na širok spektar kanceranih ćelijskih linija kako životinjskih (ćelijske linije: fibrosarkoma (L929), makrofage - Abelson murine leukemia virus transformed (RWA264.7), kancera jetre (AH130)) tako i humanih (ćelijske linije kancera: cerviksa (HeLa), pluća (A549), dojke (MCF-7), kolona (HCT-15, HT-29, HCT 116), jetre (Hep3B, HepG2), prostate (PC-3) i promijeloidne leukemije (HL-60)) (Saleem i sar, 2005). Mehanizmi citotoksičnog delovanja ovih lignana su različiti:

- inhibiraju fosfolipazu C koja ima bitnu ulogu u proliferaciji i razvoju humanih kancera (Lee i sar, 2004);
- aktiviraju kaspazu 3 i na taj način stimulišu apoptozu (Park i sar, 2004);
- inhibiraju DNA topoizomerazu I i II (Li i sar, 2004);
- smanjuju mitohondrijalni membranski potencijal (MMP) i ekspresiju anti-apoptičkog proteina bclxL (Hausott i sar, 2003);
- inhibiraju telomerazu i ekspresiju proteina bcl2 (supresor apoptoze) i aktiviraju kaspaze 3 i 8 (Giridharan i sar, 2002).

Kardioprotektivno dejstvo - epidemiološkim studijama je utvrđeno da unošenje lignana putem ishrane može smanjiti rizik od pojave kardiovaskularnih bolesti kod starijih miškaraca i žena koje su u

adhezivnih molekula (sICAM-1 - soluble intercellular adhesion molecule) u vaskularnom endotelu i povećava protokom-posredovanu dilataciju (FMD - flowmediated dilatation) velikih krvnih sudova smanjujući vaskularnu inflamaciju i disfunkciju endotela (Pellegrini i sar, 2010).

Fitoestrogeno dejstvo - lignani odnosno njihovi metaboliti enterolignani (enterolakton i enterodiol), usled sličnosti u strukturi sa endogenim 17β -estradiolom, pokazuju estrogenu aktivnost tj. vezuju se i aktiviraju α i β estrogene receptore, promovišu sintezu proteina koji vezuje polne hormone i inhibiraju aktivnost enzima kao što su aromataza i 5α -reduktaza (Mousavi i Adlercreutz, 1992; Basly i Lavier, 2005). Ovo ih čini veoma interesantnim u tretmanima tegoba menopauze, prevenciji i terapiji hormon-zavisnih kancera dojke. Naročito je značajna prevencija kancera dojke koju ispoljavaju lignani iz lanenog semena jer smanjuju nivoe estrol sulfata i estradiola u plazmi i usmeravaju metabolizam ovih hormona sa puta 16α -hidroksilacije na put 2-hidroksilacije koji produkuje manje karcionogene metabolite (Hutchins i sar, 2001; Brooks i sar, 2004).

Anti-inflamatorno dejstvo – usled velike raznovrsnosti struktura, lignani ispoljavaju anti-inflamatorno delovanje različitim mehanizmima:

- inhibiraju enzime COX-1, COX-2 i 5-LOX (Bao-Ning i sar, 2004; Prieto i sar, 2002);
- smanjuju produkciju citokina TNF- α tako što inhibiraju MAP kinaze (ERK1/2, p38 i JNK) (Cho i sar, 2004);
- inhibiraju aktivaciju u NF- κ B i translokaciju subjediniice p65 u nukleus (Cho i sar, 2001);
- inhibiraju ekspresiju iNOS indukovanu LPS-om (Cho i sar, 2002);
- smanjuju ekspresiju adhezivnih molekula ICAM-1 i VCAM-1 indukovanu proinflamatornim citokinom TNF- α (Ahn i sar, 2001);
- smanjuju agregaciju trombocita (anti-PAF aktivnost) (Jung i sar, 1998).

Antioksidantno dejstvo - s obzirom da je u strukturi ligana prisutan veliki broj fenolnih grupa, očekivano je da će predstavnici ove grupe imati značajn antioksidantni potencijal. Međutim, u velikom broju slučajeva fenolne grupe su supstituisane, najčešće metoksi grupom, te se njihova sposobnost neutralizacije slobodnih radikala smanjuje. I pored toga, antioksidantna aktivnost ligana je demonstrirana u brojnim *in vitro* testovima kao što su ORAC, TEAC, CL, DCFH, DPPH, neutralizacija superoksid i peroksi-radikala i inhibicija lipidne peroksidacije. U *in vivo* testovima dokazano je da sprečavaju oštećenja jetre izazvana lipidnom peroksidacijom, Cu^{2+} -indukovanu oksidaciju LDL čestica, smanjuju aktivnost citohrom P450 oksidaze kao i lipidnu peroksidaciju u homogenatima jetre i mozga pazova (Saleem i sar, 2005).

Antimikrobno dejstvo - lignani ispoljavaju na nekoliko sojeva patogenih gljivica. Jedinjenje justicidin B (iz *Phyllanthus piscatorum*) inhibira rast sledećih mikroorganizama: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* i *Candida albicans* (Gertsch i sar, 2003). Lignani iz vrste *Vitex rotundifolia* su inhibirali rast meticilin-rezistentnog soja *Staphylococcus aureus* (Murakami i Tomasz, 1989).

2.3. MOLEKULSKE OSNOVE BOLESTI

2.3.1. Slobodni radikali i oksidativni stres

Slobodno-radikalske vrste predstavljaju one čestice (jone, atome ili molekule) koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona i mogu samostalno da egzistiraju (zato se i nazivaju "slobodni"). Nesparen elektron je onaj koji sam zauzima atomsku ili molekulu orbitalu. Prisustvo nesparenog elektrona ove čestice čini veoma reaktivnim, mada u nekim uslovima ta reaktivnost ne mora biti toliko naglašena. Postoji puno slobodno-radikalskih vrsta (*Tabela 2.3.*) od kojih su najzastupljeniji i najznačajniji kiseonični radikali. Pored ovih radikalskih, postoje i neradikalske vrste (nemaju nesparene elektrone) ali se takođe nazivaju reaktivnim, pre svega zato što su prekursori reaktivnijih slobodnih radikala. Obe vrste, radikalske i neradikalske, su grupisane prema atomima na kojima se nalazi nesparen elektron - npr. reaktivne kiseonične vrste (ROS - reactive oxygen species) a u *tabeli 2.3.* su navedene i ostale (Halliwell i Gutteridge, 2007).

Slobodni radikali nastaju u svim živim organizmima i imaju dvojak ulogu. S jedne strane, korisni su i čak neophodni u brojnim fiziološkim procesima. Najistaknutija je njihova funkcija u odbrambenom sistemu organizma gde učestvuju u procesu uništavanja ćelija patogena nakon fagocitoze. Makrofage, nakon opsonizacije patogena, uništavaju njegove ćelijske sisteme upravo povećanom produkcijom slobodno-radikalskih čestica što rezultuje degradacijom same ćelije mikroorganizma (Halliwell i Gutteridge, 2007). Dodatno, učestvuju u prenosu nervnih impulsa, u mehanizmima enzimskih kataliza, učestvuju u regulaciji respiracije i apoptoze mitohondrija, procesima starenja (Groves, 1999). Učestvuju u signalnim putevima tako što se, nakon vezivanja liganda za receptor, produkuju ROS i pri tom modifikuju prenos signala (Nathan, 2003). Na primer, vezivanjem EG faktora za EGFR, direktno dolazi do produkcije ROS-a, ali tačan mehanizam nije u potpunosti razjašnjen (DeYulia i sar, 2005). Azot-monoksid (NO) predstavlja izvanredan molekul u organizmu: jedan od najmanjih biološki aktivnih molekula a ima brojne, važne funkcije. Istaknuta je njegova uloga kao vazodilatatora glatke muskulature, te utiče na tonus krvnih sudova, srčani ritam i krvni pritisak. Učestvuje kao neurotransmiter u procesima učenja i pamćenja. Inhibira agregaciju i agheziju trombocita, kao i proliferaciju tumorskih ćelija i mikroorganizama (McQuaid i Keenan, 1997; Fukuto i Ignarro, 1997).

Oksidativni stres

Slobodni radikali su prisutni i produkuju se u organizmu i u fiziološkim uslovima. Njihova količina je regulisana od strane brojnih antioksidantnih sistema zaštite i dok god nije narušena ta ravnoteža, slobodni radikali ne predstavljaju opasnost po ćelijske strukture. Ukoliko se naruši odnos slobodni radikali - antioksidantni sistemi (usled povećane produkcije radikala ili smanjenja kapaciteta zaštite) nastaje oksidativni stres. U uslovima blagog oksidativnog stresa, dolazi do stimulacije proliferacije ćelija dok, kako se raste količina reaktivnih vrsta, dolazi do oštećenja biomolekula (nukleotida, lipida i proteina) i ćelijskih struktura (DNA, ćelijske membrane).

Oštećenja DNA strukture izazvano reaktivnim vrstama se ogleda najčešće kroz hemijske modifikacije azotnih baza i deoksiriboze a pri ozbiljnijim oštećenjima, do prekida DNA lanca. Najveći broj oštećenja DNA strukture izaziva visoko-reaktivni hidroksil-radikal ($\cdot\text{OH}$) ukoliko je generisan neposredno u blizini nukleusa. Ovaj radikal može da se adira na purinske baze u položajima 4, 5 i 8, i serijom transformacija dovodi do otvaranja prstena. U slučaju timina, može doći do adicije $\cdot\text{OH}$ na prsten (timin glikoli) ili oduzimanja H^\cdot sa metil grupe (alil radikal). Slična oštećenja nastaju i pri reakciji citozina sa ovim radikalom. Hidroksil radikal dodatno može reagovati sa šećernom komponentom, oduzimajući H^\cdot pri

Tabela 2.3. Reaktivne vrste u živim organizmima (Halliwell i Gutteridge, 2007).

	Reaktivne kiseonične vrste (ROS)	Reaktivne vrste azota (RNS)	Reaktivne vrste hlora (RCS)	Reaktivne vrste broma (RBS)
Slobodni radikali	superoksid anjon radikal, $O_2^{\bullet-}$	Azot-monoksid, NO^\bullet	Atomski hlor, Cl^\bullet	Atomski brom, Br^\bullet
	hidroksil radikal, OH^\bullet	Azot-dioksid, $NO_2^{\bullet\#}$		
	hidroperoksid radikal, HOO^\bullet	Nitrat-radikal, NO_3^\bullet		
	karbonatni radikal, $CO_3^{\bullet-}$			
	peroksid radikal, RO_2^\bullet			
	alkoksid radikal, RO^\bullet			
	ugljendioksid radikal, $CO_2^{\bullet-}$			
	singlet kiseonik, $^1\Sigma^+O_2$			
Neradikalne vrste		Nitritna kiselina, HNO_2	Hipohlorna kiselina, $HOCl$	Hipobromna kiselina, $HOBr$
	Vodonik peroksid, H_2O_2	Nitrozil katjon, NO^+	Nitril hlorid, NO_2Cl	Molekulski brom, Br_2
	Hipobromna kiselina, $HOBr$	Nitroksil anjon, NO^-	Hloramini	Brom-hlorid, $BrCl$
	Hipohlorna kiselina, $HOCl$	Dinitro tetroksid, N_2O_4	Molekulski hlor, Cl_2	
	Ozon, $O_3^{\#}$	Dinitro trioksid, N_2O_3	Brom-hlorid, $BrCl$	
	Singlet kiseonik, $^1\Delta_gO_2$	Peroksinitrit, $ONOO^-$	Hlor-dioksid, ClO_2	
	Organski peroksidi, $ROOH$	Peroksinitrat, O_2NOO^-		
	Peroksinitrit, $ONOO^-$	Peroksinitritna kiselina, $ONOOH^-$		
	Peroksinitrat, O_2NOO^-	Nitronijum katjon, NO_2^+		
	Peroksinitritna kiselina, $ONOOH$	Alkil peroksinitriti, $ROONO$		
	Peroksimonokarbonat, $HOOCO_2^-$	Alkil peroksinitrati, RO_2ONO		
	Nitrozoperoksikarbonat, $ONOOCO_2^-$	Nitril hlorid, NO_2Cl		
		Peroksiacetyl nitrat, $CH_3C(O)OONO_2^{\#}$		

čemu nastaju C-centrirani radikali koji, u prisustvu O₂, formiraju perokside. Mitohondrijalna DNA je podložnija štetnom dejstvu slobodnih radikala, pre svega nastalih u toku elektron-transportnog lanca ali i zbog toga što nije zaštićena histonima. Hemijski modifikovane komponente DNA mogu i međusobno da reaguju, formirajući unakrsne veze i narušavajući strukturu dvostrukog heliksa. Ove promene u strukturi DNA molekula zaustavljaju DNA transkripciju i iniciraju reparacione mehanizme. Ipak, neke mutacije, kao što je zamena baza, se mogu zadržati i nakon reparacije pri čemu posledice zavise od položaja u genu: ukoliko su u promotornom regionu, menjaće ekspresiju gena a ukoliko su u kodirajućem delu, može doći do zamene aminokiseline u sekvenci kodiranog proteina, što može menjati njegovu funkcionalnost. U slučaju ozbiljnijeg oštećenja, kao što je prekidanje DNA lanca, dolazi do iniciranja procesa apoptoze i smrti ćelije.

Proces lipidne peroksidacije predstavlja oksidativna oštećenja polinezasićenih lipida u reakcijama slobodno-radikalnog mehanizma. Mononezasićeni lipidi takođe mogu podleći oksidaciji ali ne u tolikoj meri kao lipidi sa više konjugovanih dvostrukih veza. Inicijacija lipidne peroksidacije podrazumeva "napad" slobodnog radikala na nezasićenu vezu pri čemu može doći do adicije radikala ili, mnogo češće, do oduzimanja H[•] sa a C-atoma dvostruke veze. U oba slučaja nastaje ugljenik-centrirani radikal (R[•]) koji je veoma nestabilan, kratkoživeći intermedijer. U reakcijama propagacije, ovaj intermedijer dalje može da reaguje sa polinezasićenim lipidima u svojoj blizini, oduzimajući njihov H[•], ili se vrši adicija molekula O₂ pri čemu nastaju hidroperoksidi (ROO[•]). U završnoj fazi (terminacija) ove radikalske vrste reaguju međusobno dajući neutralna jedinjenja (R-R, ROOR, ROH), koja nemaju izraženu reaktivnost kao njihovi prekursori ali pojedina mogu biti veoma toksična. Neka od njih, kao na primer malonil-dialdehid (MDH) i 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) služe kao markeri oksidativnog stresa. Oštećenjima u lipidnoj peroksidaciji najpodložniji su fosfolipidi ćelijske membrane, jer njihov "nepolarni rep" čine upravo polinezasićene masne kiseline. Kao posledica, narušava se integritet membrane te dolazi smanjenja njene fluidnosti i povećane propustljivosti za supstance koje normalno prolaze samo kroz specifične kanale (npr. Ca²⁺). U ozbiljnijim slučajevima, dezintegracijom membrane lizozima ispuštaju se hidrolitički enzimi u citosol koji mogu degradirati ćelijske proteine i ozbiljno ugroziti normalno funkcionisanje ćelije.

Oštećenje ćelijskih membrana ne podrazumeva samo oksidaciju fosfolipida, već i oštećenja membranskih proteina slobodnim radikalima. Kao i prethodno pomenuti biomolekuli, i proteini predstavljaju mete napada reaktivnih vrsta. Hemijski procesi koji se pri tom odigravaju su komplikovaniji u odnosu na reakcije reaktivnih vrsta sa DNA i lipidima jer kod proteina gotovo svaka aminokiselina može formirati nekoliko proizvoda oksidacije. Aromatične aminokiseline (Phe, Tyr i Trp) su najčešća mesta napada slobodnih radikala zbog prisustva aromatičnog prstena. Adicijom slobodnog radikala ili oduzimanjem H[•] bočni ostaci aminokiselina u proteinu mogu dalje da reaguju sa molekulom O₂ dajući perokside ili međusobno, formirajući intramolekulske veze koje menjaju konformaciju molekula proteina. Pored slobodnih radikala, oksidativna oštećenja proteina (naročito membranskih) mogu izazvati i produkti lipidne peroksidacije (MDA ili HNE). Prilikom oksidativnog oštećenja proteina, menja se njihova konformacija a sam tim se delimično ili potpuno gubi funkcija. To narušava funkcionisanje ćelija na gotovo svim nivoima: prenos signala, enzimske reakcije, transport u i izvan ćelije itd. (Halliwell i Gutteridge, 2007).

Oštećenja nastala u toku oksidativnog stresa na molekulskom nivou, organizam u celini može prevazići bez ozbiljnih posledica. Međutim, ukoliko je organizam konstantno ili veoma često izložen štetnom dejstvu slobodnih radikala, posledice oštećenja se akumuliraju u tolikom obimu da reparacioni mehanizmi ne mogu da vrate prvobitno stanje. U takvim uslovima postoji velik rizik za nastajanje brojnih obolenja kao što su: neuromuskularna oboljenja (Parkinsonova i Alchajmerova bolest, multipla skleroza), inflamatorni procesi (reumatoidni artritis, giht), oštećenja krvnih sudova (ateroskleroza), maligne bolesti, samo starenje.

Sistemi antioksidantne zaštite

U aerobnim organizmima su se razvili brojni mehanizmi antioksidantne zaštite od oštećenja izazvanih reaktivnim vrstama. Njihova osnovna uloga je da kontrolišu nivo reaktivnih vrsta, spreče njihovo nekontrolisano stvaranje i izvrše reparaciju nastalog oksidativnog oštećenja. Postoji nekoliko podela antioksidanasa: prema prirodi i načinu delovanja se dele na enzimske i neenzimske, zatim, prema poreklu mogu biti endogeni (nastali u samom organizmu) ili egzogeni (uneti putem hrane). Najčešća podela antioksidantnih sistema jeste podela prema nivou delovanja na primarnu, sekundarnu i tercijarnu liniju odbrane.

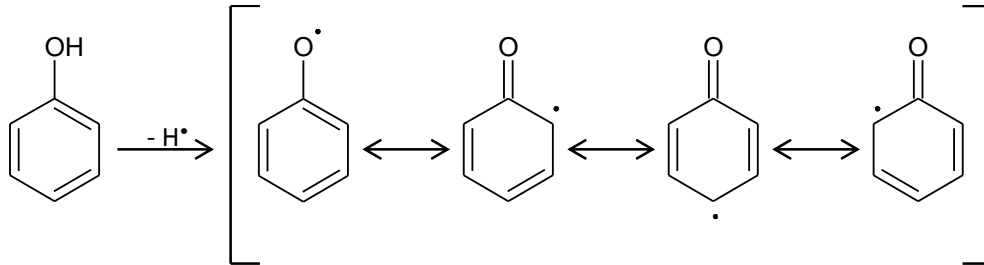
- Primarnu liniju odbrane predstavljaju enzimi koji sprečavaju nastajanje slobodnih radikala kao što su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GSHPx), glutation reduktaza (GSHR), glutation S-transferaze i peroksidaze (Px). U okviru ove prve linije odbrane, direktno se vrši prevođenje radikalskih vrsta u neradikalske oblike (SOD, CAT), smanjuje se količina prekursora radikalskih vrsta npr. H_2O_2 dejstvom peroksidaza i povećava količina redukovanog glutationa (GSHR) koji učestvuje narednom nivou antioksidantne odbrane. Proteini koji vezuju jone prelaznih metala (transferin - Fe, ceruloplazmin - Cu) takođe doprinose smanjenju produkcije slobodnih radikala Fentonovom i Haber-Weiss-ovom reakcijom.
- Sekundarna linija odbrane obuhvata antioksidanse "hvatače" slobodnih radikala koji sprečavaju inicijaciju ili prekidaju propagaciju lančanih slobodno-radikalskih reakcija. U ovu liniju odbrane spadaju uglavnom neenzimska jedinjenja kao što su: redukovani glutation, albumin, mokraćna kiselina, bilirubin, cistein, ubihinon, α -liponska kiselina, taurin i hipotaurin, tioredoksin. Pored ovih jedinjenja sintetisanih u samom organizmu, "hvatači" slobodnih radikala mogu biti i supstance unete putem hrane: tokoferoli, vitamin A, askorbinska kiselina, karotenoidi, biljni fenoli.
- Reparacioni mehanizmi predstavljaju tercijarnu liniju odbrane, i kao što im sam naziv govori, vrše reparaciju nastalih oksidativnih oštećenja. Najrazvijeniji su mehanizmi reparacije oštećene DNA i tu učestvuju enzimi endo- i egzozukleaze, DNA ligaze i DNA polimeraze. Ovi mehanizmi obuhvataju detekciju izmenjenog regiona na DNA sekvenci, njegovo isecanje i resintezu uklonjenog regiona. Proteolitički enzimi uklanjaju oštećene proteine a razne fosfolipaze ispravljaju oštećenja nastala procesom lipidne peroksidacije (Halliwell i Gutteridge, 2007).

Nastajanje slobodnih radikala u organizmu je nemoguće kontrolisati, međutim, moguće je poboljšati antioksidantne kapacitete organizma i na taj način smanjiti oštećenja koja mogu nastati u toku oksidativnog stresa. Brojna jedinjenja koja unosimo putem hrane predstavljaju dobre antioksidante a najveća pažnja je posvećena oksidantima biljnog porekla. Velik broj istraživanja je sproveden u poslednjih 30 godina sa ciljem da se definišu novi antioksidanti upravo iz biljaka. Za procenu antioksidantne sposobnosti neke supstance ili ekstrakta postoji jako veliki broj testova. Svaki od tih testova pruža različite informacije o mehanizmu antioksidantnog delovanja date supstance ili ekstrakta. Međutim, postoji sve veća potreba za standardizacijom tih metoda da bi se rezultati dobijeni u različitim laboratorijama mogli porediti (Sánchez-Moreno, 2002).

Biljni fenoli (flavonoidi) kao antioksidanti

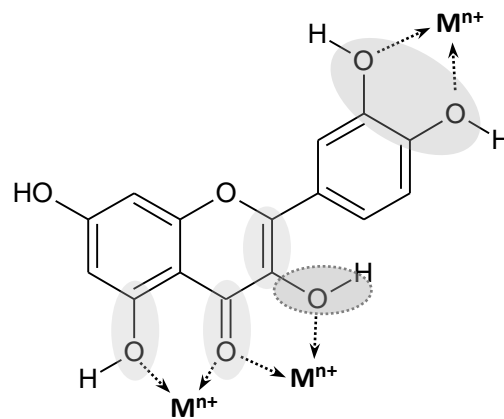
Antioksidantni koji se unose putem hrane povećavaju sposobnost organizma da spreči nekontrolisano stvaranje reaktivnih vrsta. Među egzogenim, neenzimskim antioksidantnima, najviše pažnje, u poslednje dve decenije, bilo je posvećeno biljnim fenolima. Smatra se da mehanizam njihovog antioksidantnog delovanja proizilazi iz njihove sposobnosti da doniraju H^{\cdot} i na taj način neutrališu neki radikal a sami postaju fenoksil radikali. Postavlja se pitanje zašto je to dobro i da li taj fenoksil radikal može da inicira nove slobodnoradikalske reakcije slično alkoksi radikal. Međutim, fenoksil radikali su daleko stabilniji od većine radikalskih oblika usled efekta rezonantne stabilizacije (*Slika 2.12.*). Prisustvo

barem jednog aromatičnog prstena i najčešće više fenolnih grupa u strukturi fenola (naročito flavonoida) pruža mogućnost delokalizacije slobodnog elektrona čime se smanjuje reaktivnost radikala (Rise-Evans, 1999). Pored sposobnosti da neutrališu slobodne radikale, biljni fenoli svoj preventivni antioksidantni efekat ispoljavaju tako što helatiraju jone prelaznih metala (*Slika 2.13.*) sprečavajući njihovo učešće u reakcijama u kojima se produkuju radikalne vrste (Bors i sar, 1990; Bors i sar, 1997).



Slika 2.12. Rezonantna stabilizacija fenoksil radikala

Flavonoidi, kao podgrupa biljnih fenola, se posebno ističu kao nosioci antioksidantnih svojstava. Kao što je ranije pomenuto, prisustvo aromatičnih prstenova i slobodnih fenolnih grupa čini flavonoide dobrim "hvatačima" slobodnih radikala i helatorima jona prelaznih metala. Međutim, nisu sve fenolne grupe podjednako zaslužne za to. Prema ispitivanju odnosa strukturnih komponenti flavonoida i njihove aktivnosti, došlo se do zaključka da je za aktivnost najzaslužnija slobodna OH grupa na C-3 atomu (*Slika 2.13.*). Zbog toga, flavonoidni aglikoni ispoljavaju veći antioksidantni potencijal u odnosu na svoje glikozide čija je šećerna komponenta vezana na C-3 atomu. Slično je i sa metilovanim derivatima, svako maskiranje slobodnih OH grupa smanjuje aktivnost. Prisustvo fenolnih grupa u B-prstenu doprinosi aktivnosti pri čemu je ona najveća kada postoje dve OH grupe u orto položaju, najčešće na C"-3 i C"-4. Dodatno, prisustvo dvostruke veze između C2 i C3 povećava aktivnost jer omogućava delokalizaciju nesparenog elektrona. Što se tiče fenolnih grupa u A prstenu, značajnija je grupa na C5 jer može helatirati jon metala zajedno sa karbonilnim kiseonikom na C4 (Burda i Olszek, 2001; Russo i sar, 2000).

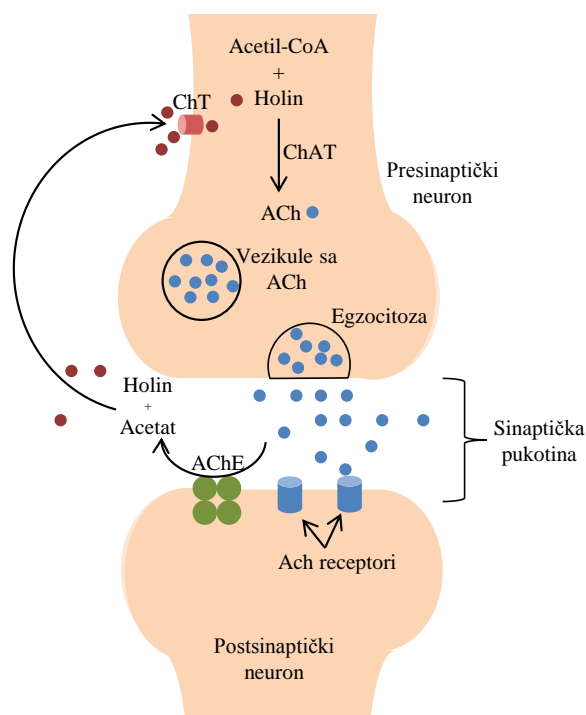


Slika 2.13. Grupe u molekulu flavonoida (kvercetina) zaslužne za antioksidantnu aktivnost.

2.3.2. Acetilholinesteraza

Acetilholinesteraza (AChE; Acetilholin: acetil hidrolaza; EC 3.1.1.7.) je jedan od najefikasnijih enzima nervnog sistema, lokalizovan u holinergičnim i neuromuskularnim sinapsama gde vrši funkciju katalize hidrolize neurotransmitera acetilholina (ACh) na holin i acetat, ubrzavajući reakciju za 8 redova veličine. Stoga, predstavlja ključni enzim u holinergičnoj sinapsi koji okončava prenos impulsa (Tripathi i Srivastava, 2008).

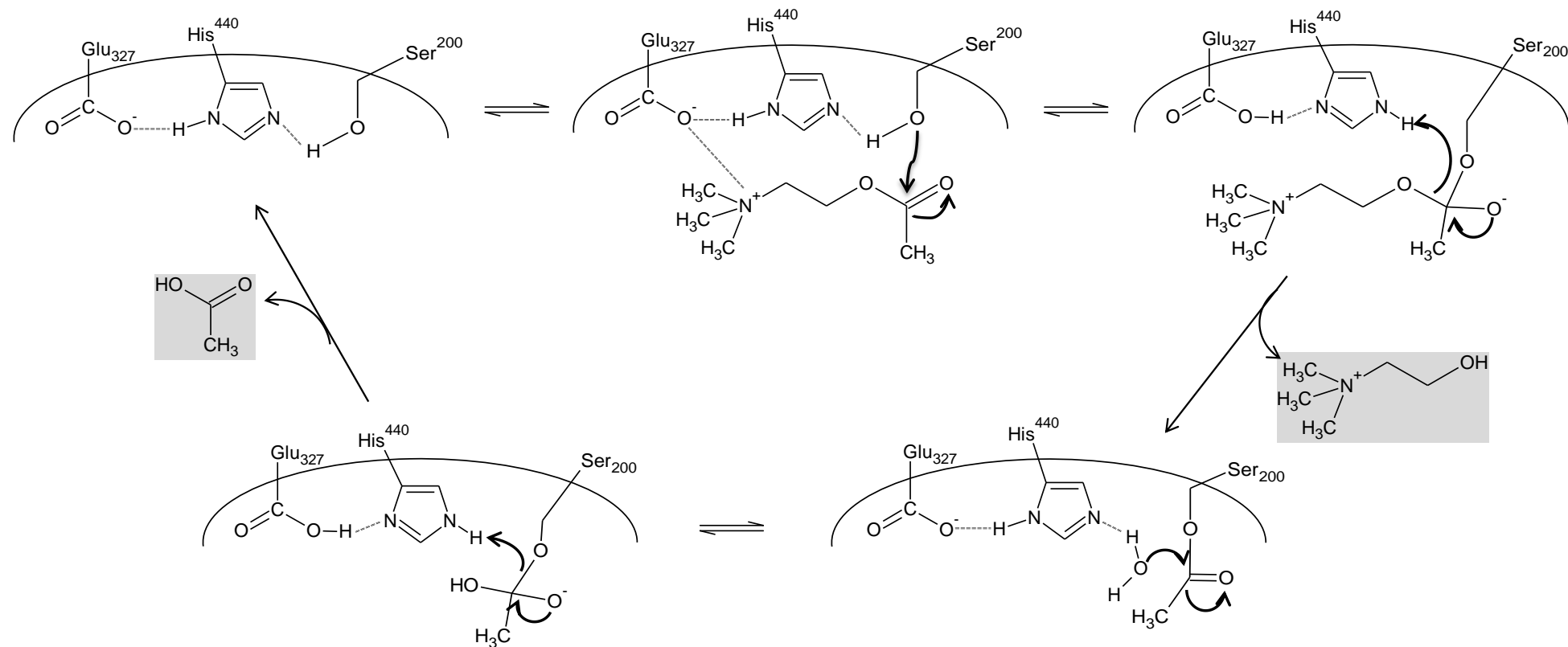
Holinergična sinapsa (*Slika 2.14.*) - nervna sinapsa u kojoj se, iz presinaptičkog neurona, kao neurotransmiter izlučuje acetilholin i vezuje se za jedan od svojih receptora na membrani postsinaptičkog neurona. Ovaj tip sinapsi dominira u parasimpatičkom nervnom sistemu ali su prisutne i u simpatikusu, odnosno, u neuromuskularnim vezama i u mozgu. U presinaptičkim neuronima, acetilholin se nalazi skladišten u vezikulama čiji se sadržaj, nakon stimulacije ćelije, egzocitozom izbacuje u presinaptičku pukotinu i neurotransmiter se vezuje za receptore na membrani postsinaptičkog neurona. Postoje dve vrste receptora za acetilholin - nikotinski i muskarinski, nazvani tako po alkaloidima koji ih blokiraju. Acetilholin se, nakon interakcije sa svojim receptorima, brzo razgrađuje dejstvom acetilholinesteraze koja je vezana za membranu postsinaptičkog neurona do holina (Ch) i acetata (AC). Oba nastala jedinjenja se eliminišu iz sinaptičke pukotine ponovnim preuzimanjem u presinaptički neuron što je olakšano posebnim nosačima-transporterima (ACT i ChT). Nakon ulaska u citoplazmu, acetat se aktivira u obliku acetilkoenzima A (acetil-CoA) i sa holinom ponovo gradi acetilholin dejstvom enzima holin acetiltransferaze (ChAT) (Whittaker, 1986; Quinn, 1987; Whittaker, 1990).



Slika 2.14. Holinergična sinapsa

(ACh – acetilholin, AChE – acetilholinesteraza, ChT – holin transporter protein, ChAT - holin acetiltransferaza.

Mehanizam hidrolize ACh katalizovan acetilholinesterazom - ovaj enzim pripada tipu serin hidrolaza i postoji u nekoliko molekularnih formi čije se katalitičke funkcije bitno ne razlikuju već je razlika u načinu vezivanja enzima za ćelijsku membranu i obliku oligomera. Aktivan je kao monomer (G1) ali je češće prisutan u obliku tetramera (G4). Samu strukturu monomera čine 12 β -nabranih pločica okruženih sa 14 α -heliksa. Aktivni centar enzima čini katalitička trijada: Ser-200, His-440 i Glu-327, slična drugim



Slika 2.15. Mehanizam reakcije hidrolize acetilholina u aktivnom centru enzima acetilholinesteraze (Tripathi i Srivastava, 2008).

katalitičkim trijadama serin proteaza, sa jedinom razlikom što je kod ovog enzima u trijadi prisutan Glu umesto Asp (*Slika 2.15.*). Ovaj aktivni centar je smešten duboko u unutrašnjosti enzima i do njega vodi tzv. aromatični prolaz, nazvan tako jer 40 % njegove površine čine 14 aromatičnih bočnih nizova aminokiselina. Na površini enzima postoji tzv. periferno anjon-vezujuće mesto, za koje se smatra da ima ulogu da orijentiše supstrat i usmeri ga kroz aromatični prolaz do aktivnog centra. Pored supstrata, za ovo mesto se mogu vezivati i brojni ligandi koji na taj način menjaju konformaciju i samim tim i aktivnost enzima (Tripathi i Srivastava, 2008).

Kada acetilholin dospe u aktivni centar enzima (*Slika 2.15.*), orijentiše se tako da svojim pozitivnim tercijernim atomom azota formira dipol-dipol interakciju sa anjonom Glu-327 i da kiseonik Ser-200 vrši nukleofilni napad na karbonilni ugljenik. Formira se nestabilni, prvi tetraedarski intermedijer koji se lako razlaže na holin koji se oslobađa iz aktivnog centra i acil-Ser200. Acilovani serin podleže nukleofilnom napadu molekula vode, što je potpomognuto formiranjem vodonične veze između azota imidazolovog prstena His-440 i H-atoma vode i nastaje drugi nestabilni tetraedarski intermedijer, koji razlaganjem daje acetat (koji napušta aktivni centar enzima) i regenerisanu katalitičku trijadu enzima (Tougu, 2001).

Veoma je iznenađujuće to što je aktivni centar jednog od najaktivnijih enzima, smešten gotovo u samom centru unutar proteinske globule i povezan samo uskim prolazom sa spoljašnjom sredinom. Evidentno je da ovakva struktura enzima otežava difuziju supstrata u aktivni centar i difuziju proizvoda u suprotnom smeru. Ipak, smatra se da je enzim evoluirao u pravcu što brže moguće hidrolize a ne u pravcu optimizacije brzine difuzije supstrata. Izuzetna brzina reakcije se postiže smanjenjem slobodne energije prelaznog stanja pre svega zahvaljujući interakciji dipola u enzimu i dipola i šarži u prelaznom stanju. Sam molekul enzima, iako monomer, je prilično glomazan (60000 Da), pa uzimajući to u obzir lokacija aktivnog centra je i opravdana. Naime, polarna sredina i odgovarajuće šarže aktivnog centra je mnogo lakše kontrlisati unutar same globule nego na njenoj površini. Dodatno, ukoliko bi se reakcija odvijala bliže površini enzima, za odvijanje reakcije bilo bi potrebno konformaciono menjati i prilagođavati strukturu proteinske globule, što bi, s obzirom na veličinu molekula, zahtevalo mnogo više energije nego što zahteva difuzija u šupljinu aktivnog centra i iz nje. S druge strane, evolutivna prednost ovog enzima jeste aromatični prolaz koji deluje kao "usisivač" i obezbeđuje brzu i efikasnu distribuciju molekula supstrata do aktivnog centra. Zidovi ovog prolaza su obloženi u velikoj meri, aromatičnim bočnim ostacima pa su u mogućnosti da vežu hidrofobne katjone koji se nađu u unutrašnjosti molekula. Upravo ovakva struktura čini enzim podložnim nekompetitivnoj inhibiciji nekim voluminoznim organskim katjonima koji mogu da fizički blokiraju prolaz do aktivne šupljine (Tougu, 2001; Tripathi i Srivastava, 2008).

Klasična i neklasična funkcija acetilholinesteraze

Klasična uloga acetilholinesteraze, kao što je na početku napomenuto, jeste prekidanje prenosa signala tj. sinaptičke transmisije u kojoj je acetilholin neurotransmiter. Naime, nakon interakcije ACh sa njegovim receptorima na postsinaptičkoj membrani tj. njihove aktivacije i daljeg prenošenja nervnog impulsa, neophodno je ukloniti neurotransmiter iz sinaptičke pukotine da bi sledeći nervni impuls mogao neometano da se prenosi. Ceo proces otpuštanja ACh, njegove difuzije i reverzibilnog vezivanja za receptor traje svega nekoliko milisekundi, te je neophodno istom takvom brzinom i ukloniti ACh. Enzim acetilholinesteraza se evolutivno razvio u skladu sa svojom funkcijom te samo jedan molekul enzima može da vrši razgradnju i do 5000 molekula ACh u sekundi. Na ovaj način je omogućena brza evakuacija neurotransmitera iz međučelijskog prostora i omogućena dalja neurotransmisija (Anglister i sar, 1994).

Neklasične funkcije acetilholinesteraze podrazumevaju hidrolizu acetilholina van nervnih sinapsi ali i nekoliko funkcija koje su nezavisne od njene katalitičke funkcije kao što su:

- modulacija hematopoeze. U toku stresa aktivira se forma enzima nazvana AChE - R, pri čemu se sa njenog C-terminusa odvaja peptid od 26 aminokiselina tzv. ARP (eng. acetylcholinesterase read through peptide) koji dalje stimuliše rast i razmnožavanje CD34+ hematopoetskih progenitornih ćelija (Deutsch i sar, 2002).
- formiranje i održavanje sinapsi. CLAM proteini (eng. cholinesterase-like adhesion molecules) predstavljaju adhezivne transmembranske proteine čiji je ekstracelularni domen gotovo identičan acetilholinesterazi sa jedinom razlikom što nema katalitičku funkciju (uglavnom usled nedostatka serina u aktivnom centru). Ovi proteini imaju ulogu u formiranju brojnih tkiva, tj u ćelijskoj adheziji i formiranju ćelijskih spojeva. Usled velike strukturne sličnosti AChE sa ovim proteinima, smatra se da je i ovaj protein sposoban da učestvuje u procesu diferencijacije tkiva, naročito u formiranju nervnih sinapsi, gde je i lokalizovan (Zeev-Ben-Mordehai i sar, 2003; Gilbert Auld, 2005). Istraživanjem Darboux-a i saradnika (1996), utvrđeno je da zamenom neurotaktina (pripadnika familiji CLAM proteina) samom acetilholinesterazom, funkcija adhezivnog molekula ostaje očuvana.
- promocija rasta neurita. Dokaz ove funkcije su forme AChE koje imaju očuvanu katalitičku funkciju ali nemaju C-terminalni domen zadužen za promovisanje rasta neurita, pri čemu je enzimska uloga AChE nepromenjena ali dolazi do slabijeg razvitka aksona i dendrita nervne ćelije. Ovo je ujedno i potvrda da su katalitička i neurogena funkcija ovoga proteina nezavisne jedne od druge (Downes i Granato, 2004).
- uloga u embriogenezi. Pri ispitivanju embriona zebra riba, u slučaju mutacije AChE došlo je do otežanog formiranja mišićnih vlakana, smanjenog preživljavanja primarnih neurona i rasta dendrita (Hanneman i Wester-field, 1989).

Uloga AChE u neurodegenerativnim i neuromuskularnim poremećajima

S obzirom na krucijalnu ulogu ovog enzima u holinergičnim sinapsama, očekivana je i njegova uloga u patološkim procesima neurodegenerativnih i neuromuskularnih poremećaja. U većini ovih bolesti dolazi do smanjene holinergične funkcije što zbog smanjene produkcije ACh, što zbog nefunkcionalnih receptora za ACh te je jedan od načina povećanja efektivne količine neurotransmitera smanjenje njegove razgradnje tj. reverzibilna inhibicija enzima AChE. Veoma je bitno, pri selekciji inhibitora ovog enzima za primenu u medicinske svrhe, odabrati reverzibilni inhibitor, koji se najčešće vezuje za periferno anjon-vezujuće mesto a ne u aktivnom centru enzima. Ireverzibilnom inhibicijom ovog enzima dolazi do trajnog prekida holinergične transmisije te se ovakvi inhibitori AChE ispoljavaju toksično dejstvo na organizam.

Glaukom je poremećaj prekomernog nakupljanja tečnosti u oku. Usled toga dolazi do povećanja očnog pritiska, što dovodi do oštećenja očnog živca i ukoliko se ne tretira, do slepila. U tretmanu glaukoma se koriste organofosfatna jedinjenja (diizopropil fluorofosfat) kao ireverzibilni inhibitori AChE u obliku kapi i masti, isključivo za lokalnu upotrebu (Rhee i sar, 2001).

Myasthenia gravis je autoimuni poremećaj gde organizam proizvodi antitela koja blokiraju acetilholinske receptore na postsinaptičnoj membrani sprečavajući na taj način prenos impulsa. Pored imunosupresora, u terapiji ovog poremećaja se koristi fizostigmin, alkalod izolovan iz biljke *Physostigma venenosum*, kao reverzibilni inhibitor AChE, čime se smanjuje razgradnja Ach. Time se povećava efektivna količina ovog neurotransmitera u sinapsi i na taj način se prevazilazi nedostatak funkcionalnih receptora (Herkert i sar, 2011).

Sporo-reverzibilni inhibitor AChE, rezveratrol - semisintetski derivat fizostigmina, se primenjuje u terapiji demencija kao što su Parkinsonova bolest i demencija sa Levijevim telima (DLT). Kod obe bolesti

dolazi do nakupljanja malih proteina u nervnim ćelijama i formiranja plakova, kao i smanjenja količine neurotransmitera (npr. ACh) i generalno do prekida kontakta između nervnih ćelija (Chitnis i Rao, 2009).

Organofosforna jedinjenja (OP) deluju kao nervni otrovi najčešće tako što vrše ireverzibilnu inhibiciju esteraza u centralnom nervnom sistemu (pa samim tim i acetilholinesteraze) i na taj način direktno inhibiraju prenos nervnih impulsa što u većini slučajeva dovodi do smrti (Boublik i sar, 2002). Organofosforna jedinjenja deluju kao analozi supstrata AChE, ulaze u aktivni centar enzima i kovalentno se vezuju za OH grupu serina. Slično procesu acilacije enzima prilikom hidrolize ACh, u slučaju OP dolazi do fosforilacije serinskog ostatka. Međutim, dok acilovani serinski ostatak brzo i lako hidrolizuje i daje regenerisan enzim, proces defosforilacije je mnogo sporiji (traje danima) tj. enzim je nefunkcionalan za dalju razgradnju neurotransmitera. Usled inhibicije enzima dolazi do akumulacije ACh u sinapsi, prekomerne stimulacije nikotinskih i muskarinskih receptora tj. otežane ili čak onemogućene neurotransmisije. Klasični simptomi trovanja organofosfatima su uznemirenost, slabost mišića, mioza, povećano lučenje pljuvačke, znojenje. U slučaju ozbiljnog trovanja može doći do prestanka disanja, nesvestice, konfuzije grčeva i smrti (WHO, 1986; Costa, 2006).

Inhibitori AChE u terapiji Alchajmerove bolesti

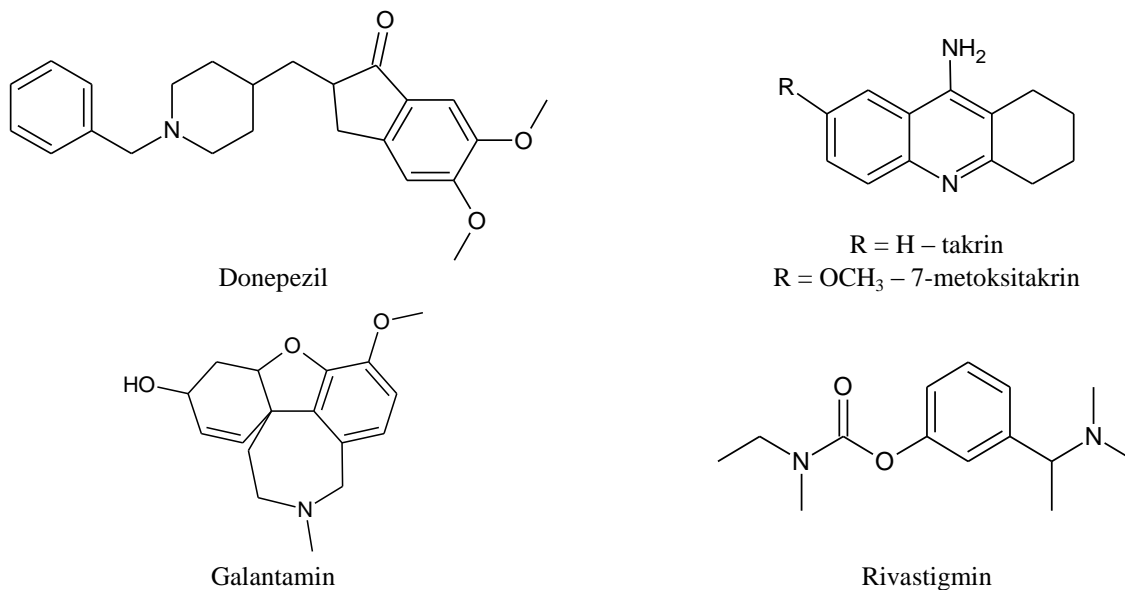
Alchajmerova bolest (AD - Alzheimer's disease) je progresivni neurološki poremećaj, najčešći oblik demencije, koji je praćen gubitkom memorije i ostalih intelektualnih sposobnosti u tolikoj meri da onemogućavaju normalan život (Thompson i sar, 2012). Patologija bolesti je povezana sa gubitkom funkcije holinergetičnih neurona u mozgu i smanjenog nivoa neurotransmitera ACh (Lane i Potkin, 2006). Brojni fiziološki procesi koji se dešavaju u toku AD-a oštećuju ili čak uništavaju ćelije koje proizvode ACh i na taj način smanjuju nivo neurotransmitera i otežavaju prenos nervnog impulsa. Inhibirajući aktivnost enzima AChE, održava se nivo neurotransmitera ACh jer se smanjuje njegova razgradnja. S toga je glavna meta terapije AD-a, inhibicija AChE u mozgu (Stahl, 2000; Giacobini, 2004). Iako ne postoji način da se ova bolest izleči, kao terapija se primenjuju reverzibilni inhibitor AChE koji ublažavaju simptome gubitka memorije, sposobnosti govora i ostalih kognitivnih funkcija. Lekovi, trenutno odobreni od strane odgovornih tela kao što su u Sjedinjenim Američkim državama FDA (Food and Drug Administration) i EMA (European Medicines Agency) u Evropi, u terapiji Alchajmerove bolesti su: donepezil, rivastigmin i galantamin kao reverzibilni inhibitori AChE (Birks, 2006; Bond i sar, 2012; Hyde i sar, 2013). Takrin je bio prvi AChE inhibitor odobren u tretmanu AD (1993. godine) ali se pokazalo da ima brojna neželjena dejstva (između ostalog hepatotoksičan je) te je vrlo brzo prestao da se upotrebljava (Watkins i sar, 1994).

Donepezil (Slika 2.15.) je selektivni, reverzibilni inhibitor acetilholinesteraze koji se vezuje za periferno anjon-vezujuće mesto na enzimu. Povećava količinu dostupnog ACh ali i smanjuje nakupljanje i odlaganje almiloidnog plaka te ne samo da ublažava simptome bolesti već i sprečava dalje pogoršanje (Arce i sar, 2009; Castro i Martinez, 2006). Iako je glavna terapijska upotreba ovog leka da ublažava simptome blage i srednje AD, u nekim kliničkim studijama se pokazalo da donepezil (komercijalno ime Aricept) povećava kognitivne sposobnosti pacijenata sa uznapredovalim simptomima ove bolesti (Winblad, 2006). Upotrebljava se u obliku tableta za oralnu upotrebu, ima biodostupnost od 100 % i slobodno prolazi krvno-moždanu barijeru. Ipak, mogući neželjeni efekti pri upotrebi ovog leka su poremećaji funkcije digestivnog trakta te ovo ograničava njegovu upotrebu (Farlow i sar, 2011; Tayeb i sar, 2012).

Rivastigmin (Slika 2.15.) predstavlja sporo reverzibilni, karbamatni inhibitor AChE koji blokira njenu aktivnost tako što se kovalentno vezuje, estarskom vezom, u aktivnom centru enzima. Predstavlja semisintetski derivat alkaloida fizostigmina i komercijalno ime mu je Exelon (Čolovic i sar, 2013). Odobren je za upotrebu u tretmanima blagih i srednjih oblika AD u 60 zemalja, uključujući sve članice EU

i USA (Desai i Grossberg, 2005). Lek se upotrebljava u obliku kapsula ili sirupa, oralno i ima 40 % biodostupnosti. Kako lek može dovesti do poremaćaja u digestivnom traktu, može se aplicirati i preko kože upotrebom flastera sa rivastigminom (Inglis, 2002; Winblad i sar, 2007).

Galantamin (Slika 2.15., trgovačko ime Razadyne, Nivalin) je alkaloid izolovan iz biljke *Galanthus woronowii* i primenjuje se u terapijama blagih i srednjih oblika AD-a. Predstavlja selektivni, kompetitivni i brzo-reverzibilni inhibitor AChE koji intereaguje sa anjon-vezujućim mestom kao i sa aminokiselinskim ostacima u aromatičnom prolazu (Bartolucci i sar, 2001; Pilger i sar, 2001; Kitisripanya i sar, 2011). Dodatno, ovaj alkaloid se vezuje kao alosteri ligand na nikotinske receptore i menja njihovu konformaciju i čini ih aktivnijim tj. osetljivijim na interakciju sa ACh-om (Wessler i Kirkpatrick, 2008). Pošto je u toku Alchajmerove bolesti primećeno smanjenje broja nikotinskih receptora, na ovaj način galantamin dodatno ublažava simptome AD-a. Zbog ovakvog uticaja na nikotinske receptore, galantamin utiče ne samo na holinergičnu transmisiju već i na vezivanje drugih neurotransmitera kao što su GABA, monoamini, glutamati. Apsorpcija galantamina je brza, sa biodostupnošću od 80 - 100 %, ali sa neželjenim efektima istim kao i kod prethodna dva leka (Čolovic i sar, 2013).



Slika 2.15. Strukture reverzibilnih inhibitora AChE koji se primenjuju u terapiji Alchajmerove bolesti.

Upoređujući efekte ova tri leka, nema značajne razlike u efikasnosti u terapiji AD. Međutim, donepezil je donekle ispoljava manje negativnih efekata na gastrointestinalni trakt od ostala dva (Tayeb i sar, 2012).

Pored ovih lekova odobrenih od strane FDA i EMA, novi inhibitori AChE su sintetisani i testirani. Jedan od njih je derivat hepatotoksičnog takrina - 7-metoksitakrin, koji se vezuje za periferno anjon-vezujuće mesto na enzimu i jače inhibira enzim od samog takrina a manje je toksičan (Pohanka i sar, 2008). Još jedan alkaloid - hiperzina A predstavlja inhibitor AChE vezujući se za periferno anjon-vezujuće mesto. Izolovan je iz biljke *Huperzia serrata* a takođe može se i sintetisati. Pored toga što inhibira AChE, smanjuje i formiranje amiloidnog plaka (Gao i sar, 2009).

U procesu traženja i odabira novijih, selektivnijih inhibitora AChE u tretmanu AD, pristupilo se sintetisanju dvokomponentnih jedinjenja sa dvojakim delovanjem: donepezil-takrin, oksoizoaporfin-takrin, derivati kumarina i hiperzina A itd. Prednost ovakvih komponenti jeste što imaju mogućnost vezivanja istovremeno i na periferno i na katalitičko mesto enzima i predstavljaju obećavajuće nove lekove za tretman AD (Alonso i sar, 2005; Yan i sar, 2009; Tang i sar, 2011; Catto i sar, 2013).

2.3.3. Nespecifični imuni odgovor

Nespecifični (urođeni, prirodni) imunitet predstavlja mehanizme odbrane bilo kog višćelijskog organizma koji su uvek prisutni i spremni da eliminišu mikroorganizme. Zajednička osobina ovih mehanizama je da prepoznaju mikroorganizme i odgovaraju na njih ali da ne reaguju protiv neinfektivnih supstanci. Takođe, prepoznaju i bore se protiv ćelija domaćina koje su oštećene od strane mikroorganizama. Za razliku od urođene imunosti, stečena imunost mora da bude stimulirana mikroorganizmima i da se adaptira prema njima pre nego što postane efikasna. Pored toga, stečeni imuni odgovor može da bude usmeren kako protiv infektivnih antigena, tako i protiv onih neinfektivne prirode.

Dugo se smatralo da je urođena imunost nespecifična i slaba i da nije efikasna u borbi protiv većine infekcija. Međutim, ona ipak specifično prepoznaje mikroorganizme i predstavlja moćan rani mehanizam odbrane, sposoban da kontroliše, pa čak i eliminiše infekcije pre nego što se stečena imunost aktivira. Urođena imunost ne samo da omogućava ranu odbranu od infekcija već, takođe, upućuje stečeni imuni sistem kako da na što efikasniji način odgovori na različite patogene. S druge strane, stečeni imunski odgovor često koristi mehanizme urođene imunosti u eliminaciji infekcija. Dakle, ova dva sistema se međusobno pomažu i nadopunjuju u borbi protiv patogena (Abbas i Lichtman, 2006).

Prepoznavanje mikroorganizama od strane urođenog imunog sistema

Komponente urođenog imunog sistema prepoznaju strukture koje su zajedničke za određene klase mikroorganizama a nisu prisutne na ćelijama domaćina. Svaka komponenta urođene imunosti može da prepozna mnoge bakterije, viruse ili gljivice. Na primer, fagociti ekspresuju receptore za lipopolisaharid bakterija (LPS ili endotoksin), koji učestvuje u izgradnji spoljnog zida Gram-negativnih bakterija i ne proizvode ga ćelije sisara. Drugi receptori fagocita prepoznaju terminalne rezidue manoze na glikoproteinima - mnogi bakterijski glikoproteini poseduju terminalno postavljenu manozu, za razliku od glikoproteina sisara, koji se završavaju sijalinskom kiselinom ili N-acetilgalaktozaminom. Fagociti prepoznaju i odgovaraju na dvolančanu RNK, koja se nalazi u virusima, ali ne i u ćelijama sisara, kao i na nemetilovane CpG dinukleotide, koji su uobičajeni u bakterijskoj DNK, a ne nalaze se u DNK sisara. Molekuli mikroorganizma koje prepoznaje urođena imunost ponekad se nazivaju **molekulski obrasci povezani sa patogenom** (eng. *pathogen-associated molecular patterns* - PAMPs), da bi se naznačilo da su prisutni na mikroorganizmima koji pripadaju istom tipu. Receptori urođene imunosti koji prepoznaju PAMP nazivaju se receptori za prepoznavanje obrazaca (eng. *pattern recognition receptors* – PRRs). Pojedine komponente urođene imunosti mogu da se vežu za ćelije domaćina, ali je njihova aktivacija sprečena od strane tih ćelija. Npr. ako se proteini plazme sistema komplementa istalože na ćelijama domaćina, njihova aktivacija je blokirana od strane regulatornih molekula koji su prisutni na ovim ćelijama, ali ne i na mikroorganizmima.

Druga komponenta urođene imunosti, koja je čini visokoefikasnim odbrambenim mehanizmom, jeste da su komponente urođene imunosti evoluirale tako da prepoznaju one strukture mikroorganizama - PAMP, koje su im često neophodne za preživljavanje i infektivnost, kao što su peptidoglikan kao sastojak ćelijskog zida praktično svih bakterija i LPS kao sastojak spoljašnje membrane svih Gram negativnih bakterija. S toga, mikroorganizam ne može da izbegne urođenu imunost samo tako što mutira ili prestane da ekspresuje molekule koje prepoznaje urođena imunost. Oni mikroorganizmi koji ne ekspresuju funkcionalne forme tih struktura gube sposobnost da inficiraju i kolonizuju domaćina.

Receptori na ćelijama urođenog imunskog sistema kodirani su funkcionalnim genima nasleđene DNK i ne nastaju somatskom rekombinacijom gena kao kod stečene imunosti. Genskom rekombinacijom može da se stvori mnogo više strukturno različitih receptora nego na osnovu nasleđenih gena, te je specifičnost stečene imunosti daleko veća i receptori su klonski raspoređeni - svaki klon limfocita ima receptor za određeni antigen. Suprotno tome, u urođenom imunom sistemu receptori nisu klonski

raspoređeni tj. identični receptori se nalaze na svim ćelijama određenog tipa, npr makrofagama. Zbog toga mnoge ćelije urođene imunosti mogu da prepoznaju isti mikroorganizam.

Urođeni imuni odgovor je uvek isti, bez obzira da li je to prvi ili bilo koji naredni susret sa istim mikroorganizmom tj. nema fenomen imunološke memorije kao stečeni imuni odgovor. Imunološka memorija obezbeđuje visoku efikasnost odbrambenih reakcija domaćina protiv ponovljenih ili perzistentnih infekcija.

Prednost urođenog imunskog sistema u odnosu na stečeni je što ne reaguje protiv domaćina (ne reaguje na sopstveno). Ovo svojstvo urođenog imunog sistema da ne reaguje protiv sopstvenih ćelija i molekula zasnovano je delom na specifičnosti urođene imunosti za strukture mikroorganizma, a delom na činjenici da ćelije sisara ekspresuju regulatorne molekule kojima se sprečavaju reakcije urođene imunosti (Abbas i Lichtman, 2006; Rang i sar, 2004).

Komponente urođenog imunog odgovora

Urođeni imuni odgovor formiraju epitelne barijere, ćelije u cirkulaciji i tkivima, neki proteini plazme i vaskularni događaji.

➤ Epitelne barijere - uobičajena mesta ulaska mikroorganizama u telo domaćina su koža, gastrointestinalni i respiratorni trakt, koja su zaštićena kontinuiranim epitelom koji obezbeđuje fizičku i hemijsku barijeru za infekciju. Epitelne ćelije takođe produkuju peptidne antibiotike koji ubijaju bakterije. Osim toga, u epitelu se nalazi i poseban tip limfocita nazvan intraepitelni limfociti za koje se pretpostavlja da imaju ulogu čuvara protiv onih infektivnih agenasa koji pokušavaju da prodru kroz epitel.

➤ Ćelije u cirkulaciji i tkivima - neutrofili, monociti/makrofage i NK ćelije. Neutrofili i monociti predstavljaju ćelije krvi koje bivaju privučene na mesta infekcije, gde prepoznaju i ingestiraju mikroorganizme da bi ih eliminisali kroz proces intracelularnog ubijanja. Neutrofili predstavljaju tip ćelija koji prvi odgovara na većinu infekcija, naročito one izazvane bakterijama i gljivicama. U cirkulaciji, neutrofili ingestiraju mikroorganizme, a na mestima infekcije, ove ćelije, brzo prelaze u ekstravaskularne prostore tkiva, gde takođe ingestiraju mikroorganizme i umiru u roku od nekoliko sati. Za razliku od neutrofila, monociti koji napuste krvne sudove i pređu u tkiva preživljavaju dugo tako što se diferenciraju u makrofage. Neutrofili i makrofagi migriraju u ekstravaskularna mesta infekcije tako što se vezuju za adhezivne molekule na endotelu i odgovaraju na hemotaktične supstance koje se stvaraju pri susretu sa patogenima. Prepoznaju patogene u krvi i tkivima površinskim receptorima (PRR) koji prepoznaju PAMP što rezultuje fagocitozom patogena i aktivacije fagocita da ubiju ingestirane patogene. NK ćelije (eng. *natural killer*) su klasa limfocita koji odgovaraju na intracelularne mikroorganizme ubijanjem inficiranih ćelija i produkcijom citokina IFN- γ , koji aktivira makrofage. Ćelije domaćina koje su pretrpele stres, inficirane su virusima ili intracelularnim bakterijama, ekspresuju površinske molekule koje prepoznaju aktivacioni receptori na NK ćelijama i one ih napadaju.

➤ Proteini plazme - sistem komplementa i citokini. Sistem komplementa predstavlja skup cirkulirajućih membranskih proteina, koji se aktiviraju tzv. enzimskom kaskadom. Postoje tri načina aktiviranja sistema komplementa: alternativni put se pokreće kada se neki proteini komplementa aktiviraju nakon kontakta sa patogenom i u ovom slučaju predstavlja deo nespecifičnog imunog odgovora; klasični put aktivacije se pokreće nakon što se antitela vežu za patogene i predstavlja deo humoralnog IO; lektinski put biva pokrenut kada se protein plazme lektin koji vezuje manozu, veže za terminalne rezidue manoze glikoproteina na površini patogena i predstavlja deo urođenog IO. Citokini su proteini koje luče limfociti (najviše makrofagi) i posreduju u mnogim ćelijskim reakcijama u nespecifičnom imunom odgovoru. Oni se produkuju u malim količinama kao odgovor na spoljašnje stimulse kao što su patogeni. Interakcija PRR - PAMP na makrofagama rezultuje povećanom sekrecijom proinflammatoryh citokina, najčešće, TNF α (eng. *tumor necrosis factor α*) i IL-1 (interleukin-1). Na ćelijama na koje deluju vezuju se za

visokoafinitetne receptore i pokreću signalne puteve koji rezultuju aktivacijom određenih gena tj. produkcijom proteina koji dalje povećavaju imuni odgovor. U reakcijama urođene imunosti na infekcije može da se aktivira dovoljan broj makrofaga da produkuju veliki broj citokina koji tada mogu da deluju i na mestima udaljenim od mesta njihove sekrecije. Posebnu grupu citokina čine hemokini čija je glavna uloga da regrutuju leukocite do mesta inflamacije i regulišu njihovu migraciju iz krvi u tkiva.

➤ Vaskularni događaji - obuhvataju inicijalnu dilataciju malih arteriola, sa povećanjem protoka krvi, a zatim usporavanje protoka i stazu krvi, sa povećanjem permeabilnosti postkapilarnih venula i eksudacijom tečnosti. Nakon interakcije PRR - PAMP oslobađaju se citokini, faktor agregacije trombocita (eng. *platelet activating factor* - PAF), histamin, prostaglandini (PG) E₂ i I₂ odgovorni za inicijalnu fazu povećane vaskularne permeabilnosti. Endotelne ćelije krvnih sudova ekspresuju nekoliko adhezivnih molekula (familije ICAM i selektina) za koje se vezuju integrini prisutni na površini leukocita, što im omogućava migraciju izvan krvnog suda i na taj način usmeravaju leukocite na samo mesto inflamacije (Abbas i Lichtman, 2006; Rang i sar, 2004).

2.3.3.1. Eikozanoidi kao medijatori inflamacije

Eikozanoidi su lipofilne komponente uključene u kontrolu mnoštva fizioloških procesa i spadaju među najvažnije medijatore i modulare zapaljenskih reakcija. Glavni predstavnici su prostaglandini (PG), tromboksani (TX) i leukotrijeni (LT). Glavni izvor eikozanoida je arahidonska kiselina (5,8,11,14-eikozatetraenska kiselina), nezasićena masna kiselina sa 20 C-atoma koja sadrži četiri dvostruke veze. Ona se u obliku fosfatnog estra nalazi ugrađena u fosfolipide ćelijske membrane. Veliki broj stimulusa može da oslobodi arahidonsku kiselinu a oni se zavise od tipa ćelija. Tako je, na primer, trombin stimulus za trombocite, C5α (komponenta komplekta) za neutrofile, bradikinin za fibroblaste a reakcija antigen-antitelo za mastocite (Rang i sar, 2004).

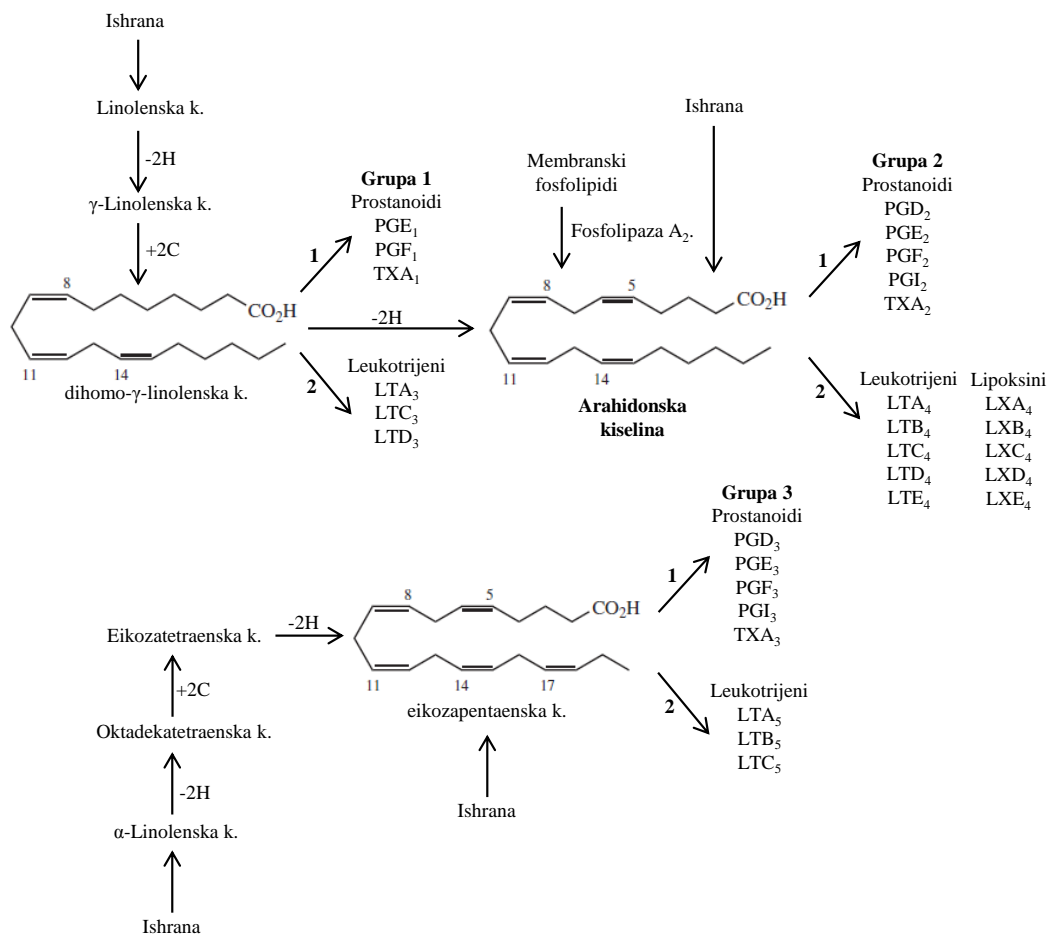
Biosinteza eikozanoida

Sposobnost sinteze eikozanoida imaju sve ćelije ljudskog organizma osim eritrocita, a njihovo prisustvo dokazano je i u životinjskim i biljnim ćelijama. Proizvodnja eikozanoida je naročito povećana tokom inflamacije, a njihovi biosintetski putevi su posebno klinički značajni jer proizvodi koji nastaju su uključeni u patogenezu različitih poremećaja funkcija imunog sistema. Oslobađanje arahidonske kiseline iz ćelijske membrane predstavlja početnu i ključnu reakciju u biosintezi eikozanoida i može se odvijati u jedno- ili dvo-stepenom procesu. U jednostepenom procesu, arahidonska kiselina, koja se najčešće nalazi u položaju 2 fosfolipida oslobađa se direktnim dejstvom PLA₂ (slika XX), dok su u dvostepeni proces uključene i fosfolipaza C i DAG (diacilglicerol) lipaza. Fosfolipaza C specifično hidrolizuje fosfatidilinozitol uz nastajanje inozitoltrifosfata (IP₃) i 1,2-diacilglicerola (DAG) koji se dalje hidrolizuje pomoću DAG lipaze oslobađajući arahidonsku kiselinu (Rang i sar, 2004).

Pored arahidonske kiseline, kao prekursori u biosintezi eikozanoida mogu poslužiti i masne kiseline koje nastaju iz esencijalnih MK: dihomog- γ -linolenska i eikozapentaenska kiselina (Slika 2.16.) i u zavisnosti od prekursora imamo tri grupe (ili serije) eikozanoida: grupa 1 - nastaje iz dihomog- γ -linolenske kiseline (8,11,14-eikozatrienska kiselina); grupa 2 - iz arahidonske kiseline (5,8,11,14-eikozatetraenska kiselina) i grupa 3 - iz eikozapentaenske kiseline (5,8,11,14,17- eikozapentaenska kiselina). Iz sva tri prekursora nastaju jedinjenja sličnih struktura pri čemu je glavna razlika broj nezasićenih veza u lancu. Svaki pojedinačni eikozanoid se označava sa četiri karaktera (3 slova i broj):

- prva dva slova - označavaju grupu eikozanoida kojoj posmatrani molekul pripada (npr. PG - prostaglandini, LT - leukotrieni, TX - tromboksani);

- treće slovo npr. A, B, C, D definiše sekvencu metabolizma masne kiseline u kojoj posmatrani molekul nastaje;
- broj u indeksu, označava broj dvostrukih veza u molekulu (Dewick, 2009).



Slika 2.16. Nastajanje tri grupe eikozanoida i njihovi biosintetski prekursori (1 – ciklooksigenazni put; 2 – lipooksigenazni put).

Ciklooksigenazni put - dejstvom enzima prostaglandin H sintaze (PGHS) odnosno ciklooksigenaze (COX) nastaju prostanoidi: prostaglandini (PGH₂, PGE₂, PGF_{2 α} , PGD₂) - dejstvom PG sintaza, prostaciklini (PGI₂, 6-keto PGF₁), tromboksani (TXA₂, TXB₂) i 12(S)-hidroksiheptadeka-5Z,8E,10E-trienska kiselina (12(S)-HHT) - dejstvom TX sintaza. Ciklooksigenaza je bifunkcionalni enzim koji ispoljava aktivnost ciklooksigenaze i peroksidaze, pri čemu postoje dva izoenzimski oblika COX-1 i COX-2. Iako predstavljaju produkte dva različita gena, poseduju sličnu strukturu i ispoljavaju dve iste katalitičke aktivnosti. 80 % aminokiselinskog sastava identično je kod oba enzima, sa najizraženijim razlikama na C- i N-terminusu i heliksima u vezivnom centru. Osnovna razlika je što COX-1 predstavlja konstitutivni enzim, prisutan u većini ćelija i smatra se da su prostanoidi koje produkuje uključeni u normalnu homeostazu (npr. regulaciju vaskularnog odgovora) dok se ekspresija COX-2 povećava u toku inflamatornog odgovora (Rang i sar, 2004).

Lipooksigenazni put - u ovoj grani biosinteze eikozanoida, nastaju leukotrijeni i lipoksini. Postoji više lipooksigenaza (LOX) u ovom metaboličkom putu od kojih svaka nosi naziv n-lipooksigenaza, gde n predstavlja broj C-atoma koji se oksiduje tj. na koji se adira molekul kiseonika. Najznačajnije lipooksigenaze su 5-, 12- i 15-LOX. 5-LOX katalizuje nastanak 5-hidroperoksieikosatetraen-kiseline (5-HPETE) i nastanak leukotriena A₄ (LTA₄) iz kojeg, dejstvom različitih enzima, nastaju i ostali leukotrijeni ove serije (LTB₄, LTC₄, LTD₄ i LTE₄). Postoje tri tipa 12-lipooksigenaza (12-LOX): leukocitna,

trombocitna i epidermalna. Pri metabolizmu arahidonske kiseline koji katalizuje 12-LOX nastaju različiti bioaktivni molekuli: 12-hidroperoksieikosatetraen-kiselina (12-HPETE), 12- hidroeikosatetraen-kiselina (12-HETE), hipoksilin A₃ i B₃ (HXA₃, HXB₃) i trioksilin A₃ i B₃ (TrXA₃, TrXB₃). 15-lipoksigenaza katalizuje reakciju nastajanja 15-hidroperoksieikosatetraen-kiseline (15-HPETE), čiji dalji metabolizam može ići u više smerova od kojih je najznacajnije nastajanje lipoksina (Curtis-Prior, 2004; Marks i Furstenberg, 1999).

Fiziološko dejstvo eikozanoida

Najpoznatija funkcija eikozanoida u ćelijama je da modifikuju upalne reakcije, utiču na simptome kao što su bol, otok i povišena temperatura. Inflamacija je u suštini koristan događaj koji dovodi do uklanjanja štetnih molekula i vraćanja normalne strukture i funkcije tkiva. Problem se javlja kada se akutna inflamacija ne sanira i kada dolazi do prekomernog oštećenja tkiva. U normalnim uslovima nivo eikozanoida u ćelijama je nizak, ali u toku zapaljenja i priroda i koncentracija prostanoida se može znacajno promeniti.

Prostaglandin E₂ (PGE₂) je efikasan vazodilatator regiona mikrocirkulacije (arteriola, prekapilarnih sfinktera i postkapilarnih venula), relaksira trahealnu i bronhijalnu muskulaturu, izaziva kontrakciju viscelarne longitudinalne musculature (urogenitalne i gastrointestinalne). U većini tkiva, odnosno ćelija, PGE₂ ispoljava svoje dejstvo vezujući se za specifične receptore koji u spoju sa G-proteinom aktiviraju ćelularni signalni sistem adenilat ciklaze, koja dovodi do porasta koncentracije intracelularnog cAMP, što za posledicu ima relaksirajući efekat. PGE₂ ima veliki značaj u fiziologiji reprodukcije, nalazi se u semenoj tečnosti gde potpomaže njeno kretanje. Kod žena, visoke koncentracije PGE₂ pred kraj trudnoce su znacajne za održavanje kontrakcija uterusa i smekšavanje cerviksa. Prostaglandin E₁ ima slično dejstvo kao PGE₂, s tim da ima snažan uticaj na inhibiciju trombocita. Prostaglandini grupa E i F izazivaju koordinirane kontrakcije tela gravidne materice, dok istovremeno relaksiraju grlic materice. PGE₂ je mocan bronhodilatator tako da se koristi u terapiji lečenja astme. PGE₂ ima izraženo proinflamatorno dejstvo i učestvuje u svim procesima koje vode do klasičnih znakova zapaljenja, bol, otok, povišena temperatura, sa druge strane ima i antiinflamatorno svojstvo kao što je suzbijanje proliferacije limfocita i inhibicija proizvodnje interleukina i nekih citokina. Prostaglandin E₂ inhibira enzim 5-lipooksigenazu koji katalizuje sintezu proinflamatornih leukotiena i podstiče aktivnost antiinflamatornih lipoksina. PGE₂ je uključen u patologiju reumatoidnog artritisa.

Tromboksan A₂ (TXA₂) se proizvodi u trombocitima, pri čemu je produkcija narocito povećana tokom njihove aktivacije. Stimuliše agregaciju trombocita, vazokonstrikciju i proliferaciju glatkih mišićnih ćelija, bronhokonstrikciju. Poluživot TXA₂ je veoma kratak, svega 20-30s nakon čega se neenzimskom hidrolizom metaboliše do TXB₂. Pored trombocita, receptori za TXA₂ postoje i na glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova. Vezujući se za G-protein zavisne receptore, tromboksan vrši aktivaciju fosfolipaze C, što dovodi do nastanka DAG i IP₃. U citoplazmi ćelije IP₃ prazni depoe Ca²⁺, što dovodi do povećanja intracelularne koncentracije Ca²⁺. Kod trombocita se to manifestuje aktivacijom i promocijom agregacije uz još veću produkciju TXA₂, a kod glatkih mišića nastaje snažna kontrakcija.

Prostaciklin I₂ (PGI₂) se sintetiše u endotelnim ćelijama i glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova iz PGH₂ dejstvom enzima prostaciklin sintaze. Deluje putem inhibicije agregacije i aktivacije trombocita i leukocita, smanjuje proliferaciju i migraciju limfocita, podstiče vazodilataciju i indukuje proizvodnju cAMP. I TXA₂ i PGI₂ su važni posrednici patoloških stanja vaskularnog sistema, uključujući aterogenezu i trombozu. Evidentno je da je za normalno funkcionisanje kardiovaskularnog sistema znacajan konstantan odnos koncentracije prostaciklina i tromboksana (PGI₂:TXA₂ = 2,5:1). Sintetički analozi prostaciklina mogu da se koriste u lečenju ishemije ekstremiteta i pulmonalne hipertenzije. PGI₂ je važan medijator edema i bola koji prate akutnu upalu, sintetiše se veoma brzo prilikom povrede ili inflamacije. Visoke koncentracije ovog prostanoida se nalaze u sinovijalnoj tečnosti u zglobovima kolena kod reumatoidnog artritisa.

Leukotrijen B₄ (LTB₄) deluje posredstvom specifičnih LTB₄-receptora, čijom aktivacijom dolazi do stvaranja IP₃ i povećanja koncentracije Ca²⁺ u citoplazmi. LTB₄ predstavlja snažan hemoatraktant za neutrofile i makrofage koji deluje u kolicinama merenim pikogramima. Takođe, kod neutrofila povećava ekspresiju membranskih adhezionig molekula i povećava stvaranje toksičnih produkata kiseonika i oslobađanje granula sa enzimima. Kod makrofaga stimuliše proliferaciju i oslobađanje citokina. Cisteinil-leukotrijeni (LTC₄, LTD₄, LTE₄) izazivaju snažne kontrakcije bronhija, vazokonstrikciju i lucenje mukusa - simptome tipične za astmu. LTE₄ ispoljava znatno slabije dejstvo u odnosu da postala dva cisteinil-leukotrijena. Male količine LTC₄ i LTD₄ date intravenski, izazivaju nagli, kratkotrajan pad krvnog pritiska i konstrikciju malih koronarnih krvnih sudova otpora (Smyth i sar, 2009; Rang i sar, 2004; Dewick, 2009).

2.3.3.2. Uloga intestinalnih epitelnih ćelija u nespecifičnom imunom odgovoru

U gastrointestinalnom traktu (GIT) svakodnevno se odvija veliki broj interakcija sa spoljašnjom sredinom, tj. intestinalna mukoza mora da toleriše milione mikroorganizama koji čine bakterijsku crevnu floru, da vari i apsorbuje hranu i odgovora indukovanjem imunog odgovora ili tolerancije u zavisnosti koji su antigeni prisutni. Sam GIT je podeljen na regione koji imaju različite funkcije pri digestiji i apsorpciji nutrijenata ali ipak postoje zajedničke karakteristike: kroz ceo digestivni trakt je prisutan jednoćelijski sloj epitelnih ćelija koje formiraju mukoze; čvrste veze između ćelija čime se formira bolja fizička barijera, sloj mukusa koji pokriva epitelne ćelije mukoze i prisustvo odgovarajućih imunih ćelija.

Efikasna epitelna barijera se sastoji od fizičkih, ćelijskih i hemijskih činilaca. Sva tri elementa su veoma povezana i nedostatak bilo kojeg rezultuje disfunkcijom barijere, odnosno, njenom povećanom propustljivošću ili disbiozom tj. promenjenom sastava crevne flore što vodi do različitih upalnih procesa. Epitel se sastoji od četiri tipa ćelija: enterocita (ili intestinalnih epitelnih ćelija), peharastih, Panetovih i enteroendokrinih ćelija. Enterociti i peharaste ćelije proizvode glikoproteine mukusa, Panetove ćelije proizvode peptidne antibiotike a enteroendokrine ćelije (ili neuroendokrine) predstavljaju deo endokrinog sistema u GIT-u (Rescigno, 2011).

Intestinalne epitelne ćelije (eng. *intestinal epithelial cells* - IECs) ne predstavljaju samo prostu fizičku barijeru, već imaju ključnu ulogu u integraciji spoljašnjih i unutrašnjih signala u imunom odgovoru. Ove ćelije na svojoj površini imaju receptore (PRR) koji prepoznaju tzv. molekulske obrasce povezane sa patogenom (PAMP) i molekulske obrasce povezane sa endogenim oštećenjem (eng. *endogenous damage-associated molecular patterns*). Receptori koji prepoznaju ove obrasce se mogu grupisati u TLR (eng. *Toll-like receptors*), NLR (eng. *nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing receptors*) i RLR (eng. *retinoic acid-inducible gene-1-like receptors*) (Creagh i O'Neill, 2006). Aktivacija ovih receptora pokreće signalne kaskade koje uključuju signalne molekule: NF-κB, IRF (eng. *interferon response factors*), aktivirajući protein-1 (AP-1) i MAP kinaze (eng. *mitogen activated protein - MAP*). Ovi signalni putevi kao rezultat imaju povećanje produkcije proinflamatornih citokina i peptidnih antibiotika ali i održavanje epitelne barijere neprobojnom i stimulaciju proliferacije epitelnih ćelija (Lavelle i sar, 2010). Pored ovih receptora, epitelne ćelije na svojoj površini ekspresuju brojne receptore za citokine kao što su IL1R, IL2R, IL4R, IL7R, TNFR1, IFNGR kao i MHC molekule klase I i II (Werner i sar, 2007; Shao i sar, 2005).

Toll-like receptori (TLR)

Ovi receptori su identifikovani na površini velikog broja sisarskih ćelija (makrofage, dendrične ćelije, B ćelije, neutrofile, fibroblasti, epitelne ćelije i keratinociti) kao receptori koji prepoznaju PAMP i nakon toga iniciraju imuni odgovor pre svega povećanom produkcijom citokina. To su transmembranski proteini koji samo jednom prolaze kroz ćelijsku membranu i sastoje se od N-terminalnog ekstracelularnog regiona bogatog leucinima (eng. *leucine-rich repeats* - LRRs) koji su zapravo zaslužni za prepoznavanje

Tabela 2.4. Vrste Toll-like receptora (TLR), njihovi ligandi i molekuli adapteri.

Lokacija	Vanćelijski prostor						Endozom			Skraćenice
Receptor	TLR2	TLR2/1*	TLR2/6*	TLR4	TLR5	TLR11	TLR3	TLR7 TLR8	TLR9	
Adapteri	TIRAP MyD88	TIRAP MyD88	TIRAP MyD88	TIRAP TRAM MyD88 TRIF	MyD88	MyD88	TRIF	MyD88	MyD88	TIR – Toll/IL-1 receptor TIRAP – TIR-containing adaptor protein MyD88 – myeloid differentiation primary response gene (88) TRAM - TIR-containing adaptor molecule TRIF - TIR-containing adaptor inducing interferon- β (INF- β) dsRNA – double-stranded RNA ssRNA – single-stranded RNA
Bakterije	Peptidoglikan (gram- pozitivne bakterije) Lipoarabinomanan (mikobakterije)	Triacil lipopeptid (bakterija <i>mycoplasma</i>)	Diacil lipopeptid (bakterija <i>mycoplasma</i>)	LPS (gram negativne bakterije)	Flagelin	Komponente uropatogenih bakterija			CpG DNA	
Virusi	Hemaglutinin (virus malih boginja)			Proteini omotači (RSV, MMTV)			dsRNA	ssRNA	DNA	
Paraziti	tGPI-mutin (<i>trypanosoma</i>)					Profilinu- slični molekuli (<i>toxoplasma gongii</i>)			Hemozoin (<i>plasmodium</i>)	

*formiraju dimere

komponenti patogena, regiona koji prolazi kroz membranu i C-terminalnog, citosolnog domena. Ovaj citosolni domen je sličan citosolnom regionu receptora za interleukin-1 (IL-1), otuda naziv Toll/IL-1 receptor (TIR) domen, koji je neophodan za prenos signala unutar ćelije. TLR familija broji preko 13 članova od kojih svaki prepoznaje različite PAMP-ove. Najvažniji TL receptori su predstavljeni u *Tabeli 2.4.* zajedno sa komponentama patogena koje prepoznaju i adaptivnim proteinima koji imaju TIR domene. Nakon vezivanja liganda za receptore, adaptivni proteini svojim TIR domenima intereaguju sa TLR-ovima i otpocinje signalna kaskada koja, najčešće, dovodi do aktivacije transkripcionog faktora NF- κ B (eng. *nuclear factor-kappa B*). Kao rezultat, povećava se produkcija proinflammatoryh citokina i hemokina, kao i ekspresija kostimulatornih molekula na dendritskim ćelijama neophodnih za aktivaciju T-limfocita (Akira i sar, 2006).

NF- κ B familija

NF- κ B familiju čine dimerni transkripcioni faktori koji sadrže Rel-homologne domene (RHDs) koji se vezuju za diskretne DNA sekvence poznate kao κ B-vezujuća mesta, prisutna u promotornim regionima brojnih gena. U sisarskim ćelijama identifikovano je pet proteina pripadnika ove familije: RelA(p65), RelB, C-Rel, p105 (NF- κ B1; prekursor p50) i p100 (NF- κ B2; prekursor p52). NF- κ B proteini formiraju homo- ili hetero-dimere i u tom obliku regulišu ekspresiju različitih gena koji učestvuju u urođenom i stečenom imunitetu, inflamaciji, anti-apoptozu, proliferaciji, u odgovoru na stres i razvoju kancera (Lemaitre i sar, 1996; Gilmore i sar, 2006). NF- κ B zavisni geni kodiraju brojne citokine i hemokine (IL-1 β , TNF α , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12), ćelijske receptore (IL2R, CD40), adhezivne molekule (ICAM-1, VCAM-1), imunoregulatorne proteine (MHC molekuli klase I i II), proteine akutne faze (β -defensin TLR) kao antiinflammatoryh enzime: inducibilnu NO sintazu (iNOS), ciklooksigenazu-2 (COX-2), fosfolipazu A₂ (PLA₂) (Campbell i Perkins, 2006).

U odsustvu stimulusa, NF- κ B je prisutan u citosolu u neaktivnoj formi vezan za inhibicioni protein - I κ B protein, koji, kada je vezan za NF- κ B sprečava njegovu translokaciju u jedro. Stimulacija TLR-a nekim ligandom pokreće brzu fosforilaciju specifičnih serinskih rezidua na I κ B proteinu pomoću multiproteinskog kompleksa IKK (I κ B kinaza) koji se sastoji iz dve katalitičke subjedinice - IKK α i IKK β , i jedne regulatorne subjedinice - NEMO (eng. NF κ B *essential modifier*, odnosno IKK γ). Fosforilacijom su I κ B proteini označeni za degradaciju i na taj način se oslobadja NF- κ B protein koji sada može da migrira u jedro (Karin i Greten, 2005; Hayden i sar, 2006).

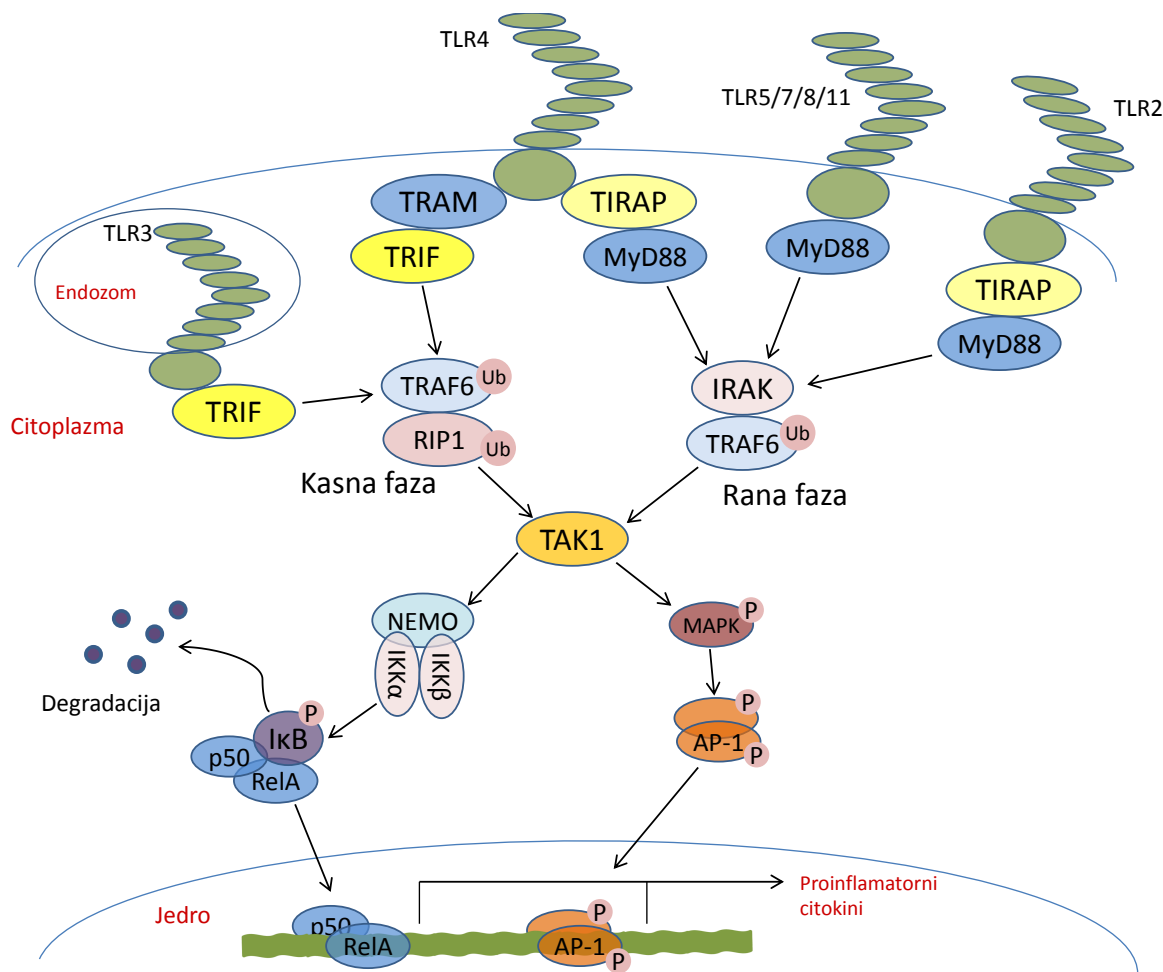
TLR - NF- κ B signalni put

Nakon vezivanja određenih liganda (PAMP), Toll-like receptori regrutuju brojne adaptore koji imaju TIR-domene kao što su (*Tabela 2.4.*): MyD88, TIRAP, TRIF ili TRAM, zavisno od vrste TLR-a. Prema tome koji je adaptivni molekul neophodan za odvijanje signalnog puta imamo MyD88-zavisan (kod većine TLR-a) i TRIF-zavisan signalni put (TLR3 i 4) (*Slika 2.17.*).

➤ Aktivacija NF- κ B preko MyD88-zavisnog signalnog puta (*Slika 2.17.*) - ovaj signalni put predstavlja ranu fazu aktivacije NF- κ B transkripcionog faktora kao odgovor na ligande vezene za TLR4. MyD88 se sastoji od TIR domena preko kojeg interaguje sa TLR i mrtvog domena (eng. *death domain*) preko koga interaguje sa mrtvim domenima IRAK (eng. IL-1 *receptor-associated kinase*) familije protein kinaza. Nakon međusobne fosforilacije, proteini IRAK familije disosuju sa MyD88 i interaguju sa TRAF6 (eng. TNF *receptor associated factor*) koji ima domen sa funkcijom ligaze tj. vrši Lys63 ubikvitinaciju ciljnih proteina, u ovom slučaju, NEMO faktora ali i samog sebe. Nakon ubikvitinacije, NEMO i TRAF6 regrutuju kompleks protein kinaza TAK1 (eng. *transforming growth factor- β -activated kinase-1*) koji ima mogućnost da aktivira dva različita signalna puta: prvi koji podrazumeva aktivaciju IKK odnosno, fosforilaciju I- κ B (kanonski put) i translokaciju NF- κ B u jedro i aktivaciju MAP kinaza (JNK, ERK1/2 i

p38) odnosno fosforilaciju AP-1 i njegovu translokaciju u jedro (Adhikari i sar, 2007; Chen i sar, 2006; Wang i sar, 2001).

➤ Aktivacija NF- κ B preko TRIF-zavisnog signalnog puta (Slika 2.17.) - aktivacijom TLR3 i 4, moguće je pokrenuti signalni put koji ide preko TRIF-a kao adapternog proteina i predstavlja kasnu fazu aktivacije NF- κ B. U ovom signalnom putu, TRIF direktno vezuje i aktivira TRAF6, koji, slično prethodno opisanoj putanji, aktivira TAK1. Međutim, TRIF, pored aktivacije TRAF6, dodatno aktivira i RIP1 (eng. *receptor-interacting protein-1*), i ove dve komponente zajedno promovišu aktivaciju TAK1 i time i aktivaciju NF- κ B (Jiang i sar, 2004; Meylan i sar, 2004).



Slika 2.17. Aktivacija NF- κ B faktora preko Toll-like receptora (TLR).

(TRAM - *TIR-containing adaptor molecule*; TIRAP - *TIR-containing adaptor protein*; MyD88 - *myeloid differentiation primary response gene (88)*; TRIF - *TIR-containing adaptor inducing interferon- β (INF- β)*; TRAF6 - *TNF receptor associated factor*; RIP1 - *receptor-interacting protein-1*; IRAK - *IL-1 receptor-associated kinase*; TAK1 - *transforming growth factor- β -activated kinase-1*; NEMO - *NF- κ B essential modifier*; IKK - *I κ B kinaza*; MAPK - *mitogen activated protein kinase*; AP-1 - *activating protein-1*; I κ B - *inhibitor NF- κ B*) (Kawai and Akira, 2007).

Koliko su zapravo bitne signalne molekule koje učestvuju u signalnom putu TLR4 pokazano je u eksperimentima na životinjama i ćelijskim linijama koje nemaju gene za MyD88 ili TRAF. Na primer, ćelije koje nemaju MyD88 adapter, ne uspeavaju da aktiviraju NF- κ B u ranoj fazi što rezultuje smanjenom sposobnošću produkcije proinflamatornih citokina kao odgovor na LPS. Međutim, produkcija INF- β u ovim ćelijama preko TRIF-zavisnog signalnog puta nije poremećena, što ukazuje na potpunu nezavisnost ova dva signalna puta. To je potvrđeno i u ćelijama koje nemaju TRIF adapter, kod njih je rana faza aktivacije NF- κ B funkcionisala bez smetnji ali ipak je kompletna produkcija citokina u odnosu na

normalne ćelije bila smanjena. Međutim, u slučaju ćelija koje nemaju ni jedan ni drugi adaptivni protein, potpuno je izgubljena sposobnost ćelije da aktivira NF- κ B kao odgovor na LPS. Sumarno, kod TLR4 signalinga, važna su oba signalna puta i MyD88- i TRIF-zavisani signalni put tj. i rana i kasna faza aktivacije NF- κ B za kompletiranu produkciju proinflamatornih citokina kao odgovor na LPS (Kawai i sar, 1999; Kawai i sar, 2001; Yamamoto i sar, 2003).

MAPK signalni put

Signalne kaskade koje obuhvataju MAP kinaze učestvuju u odbrambenim mehanizmima intestinalnih ćelija. Identifikovane su tri glavne kinaze: ERK (eng. *extracellular signal-regulated kinase*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) i p38 kinaza. Aktivaciju ovih signalnih molekula uzrokuju brojni vanćelijski stimuli kao što su citokini, zatim patogeni, LPS i drugi faktori stresa. Posledica aktivacije je fosforilacija tj. aktivacija brojnih nuklearnih transkripcionih faktora (Lewis i sar, 1998). ERK1/2 kaskada, označava se kao i p42/p44 MAPK, aktivira različite transkripcione faktore kao što su AP-1 (eng. *activating protein-1*), c-Jun, c-Fos i Elk-1 ali i membranske proteine (npr. fosfolipazu A₂) (Hommes i sar, 2003). Primarna uloga ERK1/2 jeste da promovira ćelijski rast i diferencijaciju. Međutim, sve je više dokaza koji upućuju na njenu bitnu ulogu u inflamatornim procesima, u aktivaciji produkcije citokina iz T-ćelija i u procesu apoptoze istih ćelija (Egerton i sar, 1996; Waetzig i sar, 2003). Kaskada JNK (izoforme JNK1, JNK2 i JNK3) se naziva i stresom-aktivirana kaskada, aktivira signalne molekule AP-1 i c-Jun kao i transkripcione faktore ATF-2 i regulira ćelijsku apoptozu i proliferaciju (Ip i Davis, 1998). Povezana je sa nekoliko patoloških procesa kao što su hronične inflamatorne bolesti i upalne bolesti creva (eng. *intestinal bowel disease* - IBD) (Johnson i Nakamura, 2007). U tom pogledu, inhibicija JNK signalnog puta kod eksperimentalnih životinja sa IBD-jem od strane različitih agenasa ukazuje na njihovo protektivno dejstvo kod kolitisa (Roy i sar, 2008). Kinaza p38 postoji u nekoliko izoformi: p38a, p38b, p38g, p38d i aktiviraju je razni ćelijski stresori i inflamatorni citokini (IL-1, TNF α). Ciljne molekule ove kaskade su transkripcioni faktor ATF-2 i MEF-255 (eng. *myocyte enhancer factor-255*) (Ono i Han, 2000; Bergmann i sar, 1998). Učestvuje u regulaciji ćelijskog ciklusa (rasta, diferencijacije i smrti) i neophodna je za normalan inflamatorni odgovor (Cuenda i Rousseau, 2007).

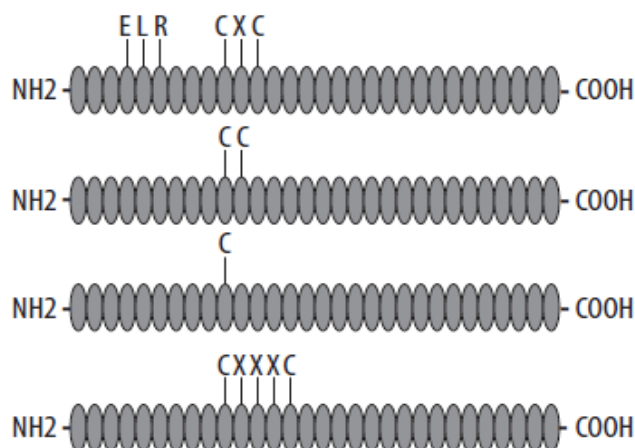
Akt signalni put

Fosfoinozidni signalni put, naziva se još i anti-apoptotički, podrazumeva regrutaciju enzima fosfatidilinozitol-3 kinaze (PI-3) do ćelijske membrane. Katalitičkim dejstvom ovog enzima nastaju PI-3,4-bifosfati ili PI-3,4,5-trifosfati. Ovi PI-3 fosfati predstavljaju vezujuće mesto za protein kinazu B (PKB ili Akt) koja se translocira iz citosola do membrane. PKB biva aktivirana fosforilacijom od strane druge kinaze (eng. *phosphoinositide dependent protein kinase-1* - PDK1) i kao takva disosuje od membrane nazad u citosol deluje na brojne signalne molekule u cilju sprečavanja apoptoze. PKB vrši fosforilaciju transkripcionog faktora "forkhead-1" koji u fosforilisanom obliku ne može da aktivira transkripciju gena za arapoptotičke proteine.

Sekrecija citokina

Aktivacijom TL receptora (najčešće TLR4), otpočinje signalna kaskada mobilizacijom brojnih signalnih molekula (MyD88, IRAK, TRAF6, TAK1, PKB i MAP kinaza) što rezultuje aktivacijom transkripcionih faktora NF- κ B i AP-1, njegovom translokacijom u jedro, vezivanjem za promotorske regione gena proinflamatornih citokina i njihovom povećanom produkcijom. Epitelne ćelije, u najvećoj meri proizvode hemokine koji imaju hemoatraktantnu i proinflamatornu funkciju: MCP-1 (eng. *monocyte chemoattractant protein-1*) i GRO α (eng. *growth related oncogene-a*) u IEC18, odnosno IL-8 (interleukin-8) u Caco-2 ćelijama, ali i proinflamatorne citokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-15, IL-18 (Romier i sar, 2009). Hemokini se dele na 4 familije, u zavisnosti od rasporeda cisteina (C) na N-terminusu: CXC, CC, XC i CX₃C (Slika 2.18.); od kojih su najbrojnije CXC (pripadaju joj GRO α i IL-8) i CC (MCP-1) koje privlače različite tipove ćelija. Generalno, CC hemokini deluju na monocite, bazofile, eozinofile i T-

limfocite dok pripadnici CXC podfamilije deluju na neutrofile, i u manjoj meri, T-limfocite (Zlotnik i Yoshie, 2000).



Slika 2.18. Strukturne razlike između podfamilija hemokina
(C-cistein, X-bilo koja aminokiselina, ELR motiv – glutamat, leucin arginin)

GRO α (eng. *growth related oncogene- α*) - član CXC podfamilije citokina, pa se označava i kao CXCL1. Po prvi put je izolovan iz i okarakterisan kao faktor rasta malignih melanoma ćelija, te se označava i kao MGSA (eng. *melanoma growth stimulatory activity*) protein. Sadrži motiv od tri aminokiseline - ELR (glutamat, leucin, arginin) motiv, između N-terminusa i prvog cisteina (Slika 2.18.). Upravo ovaj, ELR motiv, je zaslužan za glavne funkcije CXC citokina kao što su privlačenje neutrofila i stimulacija angiogeneze. Nasuprot tome, CXC hemokini koji nemaju ELR motiv predstavljaju inhibitore ovog procesa. Tako da je ravnoteža u lokalnoj produkciji CXC hemokina sa i bez prisustva ELR motiva, veoma bitna za kontrolu procesa angiogeneze. Receptor za koji se vezuje GRO α pripadaju familiji receptora vezanih za G-proteine, i označava se kao CXCR2 (ili IL8RB). Vezivanjem GRO α za njegov receptor na neutrofilima rezultuje povećanjem intracelularnog slobodnog Ca²⁺, što dovodi do egzocitoze elastaze i respiratorne eksplozije u neutrofilima. Uloga GRO α u stimulaciji angiogeneze, čini ga veoma bitnim faktorom u tumorogenezi i metastazama. Kod melanoma, gde ovaj hemokin predstavlja glavni faktor rasta ćelija, kada se neutrališe dejstvo GRO α specifičnim antitelima, dolazi do značajnog smanjenja tumorski izazvane angiogeneze. Isti efekat je zabeležen i kod tumorskih ćelija prostate. S toga možemo zaključiti da ovaj hemokin ima dvojaku ulogu u organizmu, pozitivnu - u promociji nespecifičnog inflamatornog odgovora privlačenjem neutrofila na mesto infekcije i negativnu - kad je produkovan od strane tumorkih ćelija kao autokrini faktor rasta i stimulator angiogeneze (Zlotnik i Yoshie, 2000; Anisowicz i sar, 1987; Laurence, 2005; Clark-Lewis i sar, 1991; Strieter i sar, 1995; Geiser i sar, 1993; Luan i sar, 1997; Moore i sar, 1999).

IL-8 (interleukin-8) - takođe pripadnik CXC podfamilije hemokina i dodatno se označava kao CXCL8. Kao i GRO α , sadrži ELR motif, što ukazuje da su njegove glavne funkcije - privlačenje neutrofila i stimulacija angiogeneze. Ovaj hemokin produkuje nekoliko tipova ćelija: epitelne ćelije, fibroblasti, monociti, makrofage, T limfociti, hepatociti, keratinociti i sami neutrofilii. Postoje dva receptora za koje se IL-8 vezuje i oba pripadaju familiji receptora vezanih za G-proteine. CXCR1 je receptor koji ima veću specifičnost za IL-8, dok drugi, CXCR2 receptor, pored IL-8, sa gotovo jednakim afinitetom, vezuje i GRO α , kao što je pomenuto u prethodnom pasusu, i CXCL7. Generalno, većina bioloških efekata IL-8 se ispoljava preko CXCR1 ali, zbog "deljenja" receptora sa GRO α , dosta njihovih efekata se preklapa te imaju sinergističko dejstvo. Vezivanjem IL-8 za receptor, dolazi do aktivacije fosfolipaze C i produkcije sekundarnih glasnika - IP₃ (inozitol-3-fosfat) i DAG (diacilglicerol). IP₃ povećava intracelularnu koncentraciju Ca²⁺, a DAG aktivira protein kinazu B. Ova signalna kaskada rezultuje aktivacijom

neutrofila na tri nivoa: promenom oblika i dirigovanom migracijom, egzocitozom specifičnih granula i respiratornom eksplozijom. Promena oblika neutrofila podrazumeva aktivaciju kontraktilnog sistema i omogućava neutrofilima da se pričvrste na endotelne ćelije i migriraju u tkivo. Egzocitoza podrazumeva otpuštanje proteina skladištenih u vezikulama i remodeliranje ćelijske membrane za spajanje sa membranama vezikula. Pored ove, ostale promene na membrani neutrofila, izazvane dejstvom IL-8, podrazumevaju ekspresiju specifičnih adhezivnih molekula (L-selektina) čime je povećan afinitet neutrofila da se vezuju za endotelne ćelije i prolaze u tkiva; i ekspresiju receptora za komponente komplekta (CD11b/CD18) čime neutrofili učestvuju u aktivaciji ovog sistema. Respiratorna eksplozija je rezultat aktivacije NADPH-oksidge u neutrofilima, tj. produkcije slobodnih kiseoničnih radikala u cilju uništenja ćelije patogena. Međutim, ova reakcija je karakteristična za makrofage gde je i mnogo intenzivnija, dok u neutrofilima predstavlja samo propratni efekat IL-8 (Baggiolini i sar, 1989; Baggiolini i Clark-Lewis, 1992; Paccaud i sar, 1990; Demetres i sar, 1990; Peveri i sar, 1988; Thelen i sar, 1988; Detmers i sar, 1991; Luscinskas i sar, 1992; Holmes i sar, 1991; Hoch i sar, 1996).

MCP-1 (eng. monocyte chemoattractant protein-1) - pripada CC podfamiliji hemokina (*Slika 2.18.*), i označava se i kao CCL2. Nekoliko tipova ćelija produkuje ovaj hemokin: fibroblasti, astrociti, endotelne, epitelne, mikroglija ćelije kao i monociti. U strukturi MCP-1 postoje dva regiona koja su neophodna da bi se on mogao vezati za svoj receptor - CCR2. Prvi region je između Thr-10 i Tyr-13, a drugi su rezidue 34 i 35. Osnovna funkcija MCP-1 jeste privlačenje monocita/makrofaga, T-limfocita, dendritskih i NK ćelija na mesto infekcije, kao i privlačenje i degranulacija mastocita i bazofila. CCR2 receptori su najbrojniji na monocitima. Postoje dve izoforme: CCR2A i CCR2B, pri čemu je jedina razlika u njihovim C-terminusima. Nalaze se na različitim tipovima ćelija: CCR2A na mononuklearnim ćelijama i glatko-mišićnim ćelijama krvnih sudova a CCR2B na monocitima i NK ćelijama. Takođe, moguće je da aktiviraju različite signalne puteve unutar ćelije: CCR2A - Ca^{2+} -nezavisni a CCR2B - Ca^{2+} -zavisni put. Nakon vezivanja MCP-1 za njegov receptor, mobilizuje se FROUNT adapter koji aktivira fosfatidil-inozitol-3 kinazu a inaktivira adenilat ciklazu. Nastali fosfatidil-inozitol-3 fosfat, signalingom preko Rac1 GTPaze dovodi do reorganizacije ćelijskog citoskeleta, promene oblika ćelije, degranulacije vezikula i migracije ćelije a preko Akt signalinga stimuliše preživljavanje ćelije i dodatnu produkciju citokina kao i ekspresiju adhezivnih molekula. MCP-1 usmerava diferencijaciju T-limfocita u pravcu formiranja Th2 tj. CD4⁺ T ćelija. Upravo zbog ovoga MCP-1 ima jako bitnu ulogu kod infekcije HIV-1 virusom, gde je povećana mobilizacija CD4⁺ T ćelija i monocita upravo dejstvom ovog citokina. S toga je inhibicija produkcije ovog hemokina jedan od ciljeva u tretmanu ove infekcije. Hiperprodukcija MCP-1 je registrovana i kod kancera dojke i prostate, a ima i ulogu u patogenzi ateroskleroze i Alchajmerove bolesti. Prema tome, kao i svi proinflamatorni agensi, i MCP-1 ima dvojaku ulogu: u promociji imflamacije ali u slučaju prekomerne produkcije, učestvuje u patogenezi brojnih bolesti (Ebisawa i sar, 1994; Cushing i sar, 1990; Brown i sar, 1992; Standiford i sar, 1991; Deshmane i sar, 2009; Sanders i sar, 2000).

Ekspresija COX-2 enzima

Stumulacija epitelnih ćelija različitim pro-inflamatornim faktorima, dovodi do povećane ekspresije enzima ciklooksigenaze-2 (COX-2) koja je ključni enzim u biosintezi eikozanoida (poglavlje 2.3.3.1). Indukcija COX-2 dovodi do dramatičnog porasta eikozanoida u odnosu na bazalnu produkciju posredovanu COX-1 izoformom i smatra se da su oni posrednici pro-inflamatornih reakcija. Međutim, COX-2 enzim se u ovim ćelijama i konstitutivno sintetiše i produkuje prilično male količine eikozanoida koji učestvuju u regulaciji sekrecije vode i elektrolita, kontraktilnosti i vazodilatacije (MacNaughton i Cushing, 2000). Tako da je uloga ovog enzima i njegovih produkata u epitelnim ćelijama dvojaka, naime, pored njihovg učešća u imflamaciji, važna je i njihova uloga u procesu zarastanja tkivnih oštećenja i intestinalne homeostaze. S toga, moguće je da aktivacija COX-2 enzima ima pozitivno dejstvo u terapijama različitih inflamatornih procesa u digestivnom traktu kao što je npr. Kronova bolest ili ulcerativni kolitis (Lopez-Posadas i sar, 2010).

2.3.3.2.1. Čelijske linije IEC18 i Caco-2

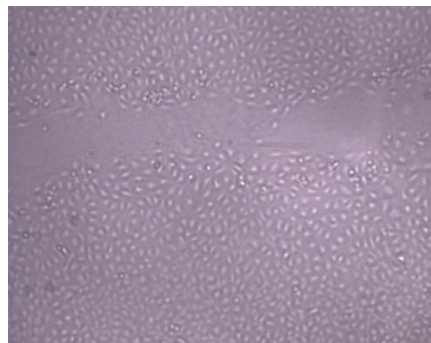
Gotovo sva istraživanja na temu biohemije, apsorpcije, imunog odgovora, metaboličkih procesa i diferencijacije ćelija gastrointestinalnog trakta su rađena na humanim tumorskim čelijskim linijama intestinuma ili tumorskim čelijskim linijama intestinuma glodara. Tumorske čelijske linije su pogodnije jer je izolacija i održavanje sveže pripremljenih enterocita veoma komplikovan proces koji značajno smanjuje mogućnosti vršenja eksperimenata na ovako dobijenim ćelijama. Zbog toga su veoma značajne normalne intestinalne čelijske linije glodara, čiji in vitro život nije limitiran - IEC (eng. intestinal epithelial cells).

Čelijska linija IEC18

Čelijska linija IEC18 predstavlja epitelne ćelije ileuma pacova (*Rattus norvegicus* – slika 2.19.) starih 14 dana. Ove ćelije imaju sve karakteristike epitelnih ćelija tj. rastu u monosloju i adherentne su (Slika 2.20.), poligonalnog su oblika, međusobno formiraju "tesne veze", rastu veoma brzo te se njihova populacija (u *in vitro* uslovima) duplira za svega 19-22h. Na apikalnoj površini imaju mikrovile a unutar ćelije prisutan je krupan Golgi kompleks. Imaju normalan diploidni kariotip, dolazi do inhibicije rasta kad se postigne određena gustina ćelija - što je veoma značajno jer ne dolazi do daljih diferencijacija ćelija, ne rastu u podlozi sa agarom i ne formiraju pravilan monosloj kad su presađene u veoma niskoj koncentraciji. Ne izazivaju tumore kada su ubrizgane singenim životinjama (Quaroni i sar, 1979; Vincentini i sar 1996). Imaju karakteristike ćelija sa sredine mikrovila, odnosno, nisu u potpunosti diferencirane. Naime, intestinalni epitel je mesto intenzivne obnove ćelija tj. procesa stvaranja ćelija iz populacije matičnih ćelija lociranih na dnu kripti i njihovog pomerenja praćenog diferencijacijom ka vrhu i apikalnoj površini mikrovila 3-5 dana kasnije, te ćelije sa sredine mikrovila nisu u potpunosti diferencirane (Pageot i sar, 2000). Na ovoj čelijskoj liniji su vršena brojna istraživanja načina apsorpcije komponenata u digestivnom traktu da bi se utvrdila njihova biodostupnost i efikasnost. Iako su u pitanju ćelije pacova, smatra se da ova čelijska linija ima veoma velike sličnosti sa epitelom humanog ileuma, a kako su od humanih ćelija GIT-a dostupne samo tumorske ćelije, može se zaključiti da IEC18 predstavlja bolji model digestivne apsorpcije (Quaroni i Hochman, 1996).



Slika 2.19. *Rattus norvegicus*



Slika 2.20. IEC18 čelijska linija pod uvećanjem od 40x.

Čelijska linija Caco-2

Čelijska linija Caco-2 predstavlja besmrtnu humane ćelije kolonorektalnog adenokarcinoma. Kada su izolovane i gajene, spontano se diferenciraju u ćelije sa morfološkim i funkcionalnim karakteristikama enterocita tj. ćelija ileuma te se stoga veoma često koriste u studijama kao model intestinalne apsorpcije (Artursson, 1991). Formiraju tesne veze, obrazuju mikrovile, rastu u monosloju i adhezivne su (Baily i sar, 1996). Međutim, primena ove čelijske linije kao model sistema intestinuma ima određene mane. Tesne veze koje obrazuju ove ćelije su tip veza koji se nalazi u epitelu kolona (a ne ileuma). Stoga je kod ispitivanja apsorpcije teško svarljivih komponenti bolji model sistem čelijska linija IEC18 (Delie i Rubas, 1997). Dodatno, Caco-2 ćelije imaju drugačiju formu citohroma P450 u odnosu na normalno epitelno tkivo

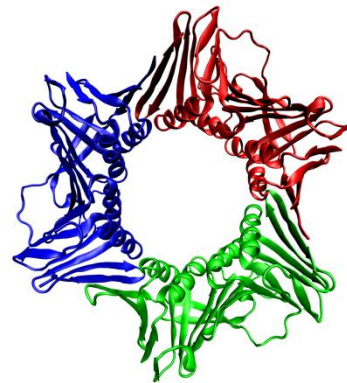
kod čoveka, pa je ograničena primena ove linije kod ispitivanja apsorpcije i metabolizma lekova. U tu svrhu je bolje primeniti ćelijsku liniju HCEC (eng. *human colonic epithelial cells*) koja predstavlja humane epitelne ćelije kolona jer imaju normani citohroma P450. Ipak, i pored postojećih mana, ćelijska linija Caco-2 predstavlja najverniji model sistem humanog intestinuma in vitro (Mace i sar, 1998).

Povreda epitela i njegova reparacija

Intestinalne epitelne ćelije (IEC) formiraju semipermeabilnu barijeru i na taj način odvajaju sadržaj lumena creva od okolnog tkiva. Ove ćelije formiraju monosloj "pravougaonih ćelija" (visina 4 puta veća od širine ćelija) i u okviru njega se konstantno pomeraju a do potpune obnove ćelija epitela dolazi na svaka 2-5 dana. Održavanje ove barijere intaktnom je esencijalno za održavanje normalnog funkcionisanja i prevencije bolesti samog digestivnog trakta ali i celokupnog organizma. Pre svega ova barijera sprečava da nepoželjni rastvori, mikroorganizmi, virusi i antigeni dospeju u unutrašnjost organizma. Same ćelije formiraju tesne, adherentne veze čime dodatno jačaju barijeru i proizvode mukus koji prekriva i štiti njihovu apikalnu površinu. Narušavanjem bilo kog od ovih faktora dolazi do povrede epitela. Povredu mogu izazvati različite toksične supstance dospele u lumen, procesi inflamacije, oksidativni stres, različiti lekovi ali mogu nastati i u toku norme digestije. Nakon povrede epitela, gotovo odmah otpočinju procesi sanacije i ponovnog uspostavljanja kontinualne barijere. Proces zarastanja uključuje migraciju, proliferaciju i diferencijaciju ćelija epitela koje okružuju mesto povrede. Prvo dolazi do restitucije epitela tako što ćelije, oko samog mesta povrede, menjaju svoj oblik iz pravougaonog/spljoštenog u zaobljeni i brzo migriraju na "prazno" mesto. Ovaj proces počinje nekoliko minuta nakon povrede epitela i ne zavisi od proliferacije jer migriraju već postojeće ćelije. Ukoliko je površina rane velika, te migracija postojećih ćelija ne može da popuni nastalu prazninu, intenzivira se proces proliferacije čime se povećava broj enterocita. I na kraju, maturacijom i diferencijacijom novoformiranih epitelnih ćelija se uspostavlja monosloj i funkcija barijere je obnovljena (Iizuka i Konno, 2011).

U okviru ovog rada, kao merilo brzine reparacije povredeneog epitela određivana je ekspresija PCNA (eng. *proliferating cell nuclear antigen*) kao antigena čija je količina proporcionalna obimu proliferacije ćelija. PCNA pripada familiji proteina koji se nazivaju DNK klizeće stege (eng. *DNA sliding clamps*) tj. β -stege koje imaju esencijalnu ulogu u procesu DNK replikacije i reparacije u toku ćelijske deobe. Formira se homotrimer oblika prstena (*Slika 2.21.*) kojim okružuje DNK nit i "klizi" po njoj u oba pravca. Sami monomeri imaju dva slična globularna domena, povezani fleksibilnim lukom. Glava-rep vezivanje monomera formira prsten čiji je unutrašnji krug čine pozitivno naelektrisani bočni ostaci aminokiselina koji se vezuju za negativno naelektrisanu nit DNK. Osnovna uloga PCNA jeste da, kada je već vezan za DNK, vezuje brojne proteine i enzime koji učestvuju u procesu replikacije i reparacije i upravlja ovim procesima. PCNA se vezuje na 3'-kraj lanca i na taj način obezbeđuje da se sinteza novog lanca odvija u pravom smeru. Zatim, svojom C stranom (nazvana tako što se na tom kraju nalaze

C-terminusi PCNA monomera) vezuje DNK polimeraze (Pol δ i Pol ϵ) i stabilizuje kompleks DNK polimeraza-DNK lanac. Prisustvo PCNA povećava aktivnost DNK polimeraza u procesu vezivanja nukleotida oko deset puta. Pored ove osnovne funkcije, PCNA učestvuje u brojnim procesima reparacije kao što je bypass replikacija (reparacija DNK lezija), zamena baza, isecanje nukleotida itd. Može se zaključiti da PCNA, koji sam nema enzimsku aktivnost, predstavlja platformu koja dirigovano vezuje enzime koji učestvuju u DNK replikaciji i reparaciji i zajedno sa njima klizi niz DNK nit stabilizujući njihov kompleks (Moldovan i sar, 2007).



Slika 2.21. Struktura PCNA (Humphrey i sar, 1996).

2.4. FARMAKOLOŠKO DELOVANJE I PRIMENA ISPITIVANIH VRSTA

Biljne vrste koje pripadaju rodovima *Urtica* i *Parietaria* su od davnina imale svoju primenu u zapadnjačkoj tradicionalnoj medicini. Međutim, svakako najpoznatija i najzastupljenija od svih je vrsta *Urtica dioica* tj. kopriva. Ona ima bogatu istoriju u tradicionalnoj medicini što potvrđuje njeno pominjanje u brojnim antičkim spisima, ali isto tako i danas veoma zastupljena u modernim istraživanjima zbog svog blagotvornog dejstva na ljudski organizam.

2.4.1. *Urticae herba* (herba koprive)

Prva upotreba herbe koprive u medicinske svrhe je zabeležena još u Starom Egiptu gde se infuz napravljn od nadzemnih delova koprive koristio za ublažavanje tegoba artritisa i lumbaga (Harrison, 1966). Grčki botaničar Teofrastus, nazivan još i ocem botanike, je u svom delu *De historia et causis plantarum*, što se smatra prvom naučnom knjigom iz oblasti fitoterapije, naveo da je napitak od koprive dobar za poboljšanje cirkulacije (Hort, 1916). Rimljanima je ova biljka i te kako bila poznata, te su legionari koristili njeno "žarenje" da poboljšaju cirkulaciju u nogama nakon dugih marševa i da se zagreju. U te svrhe su i preneli seme tzv. Rimske koprive (*U. pilulifera*) čak do Velike Britanije (Grieve, 1931). Herba koprive koja sadrži žarne dlake, se i danas koristi kao rubefacijens za ublažavanje tegoba artritisa, reumatizma i mišićnog spazama. Zbog svoje široke primene u tradicionalnoj medicini, ova biljka je postala predmet velikog broja naučnih istraživanja koja su potvrdila da kopriva poseduje mnoštvo farmakoliških aktivnosti.



Slika 2.22. Priprema čajnog napitka od nadzemnih delova koprive.

Pored upotrebe u tradicionalnoj medicini, kopriva se od davnina koristila kao zeljasto povrće u ishrani zbog izuzetnih nutritivnih svojstava. Pre upotrebe u kulinarstvu potrebno je sveze lišće prokuvati u vodi da bi popucale žarne dlake i neutralisao se njihov sadržaj. Najčešće se koristi za pripremu supa, čajeva, sokova ili pripremu pita-zeljanica (Slika 2.22.). Takođe se koristi u toku pripreme mesa da bi ga omekšala, u prezervaciji sira tako što se umotava u sveže listove koprive i u brojnim vegetarijanskim receptima (pljeskavice od koprive itd.). Razni tonici od koprive se koriste za oporavak iscrpljenog organizma (u slučajevima anemije i nakon dugih bolesti) pre svega zbog visokog sadržaja vitamina C i gvožđa (Kavalali, 2003, Grieve, 1931). Smatra se kopriva ima blagotvorno dejstvo i na organizam životinja. Naime, zabeležen je povećan prinos mleka krava u čijoj je ishrani bila zastupljeno seno koprive (Mills, 1988).

Kopriva se smatra jednom od omiljenih lekovitih biljaka u narodnoj medicini, pre svega što je prisutna svuda oko nas i što njena primena nema negativnih efekata po organizam. Zbog toga se upotreba

preparata na bazi koprive iz dana u dan se povećava kao i njena primena u ljudskoj ishrani. Ovo je opravdano brojnim naučnim istraživanjima, čime je legitimizovana upotreba ove biljke te je ona uvrštena u brojne farmakopeje sveta (British Herbal Pharmacopoeia, 1983; Ph. Eur. 6, 2007; American Herbalists Guild, 2004).

Antiinflamatorno delovanje

Antiinflamatorna svojstva različitih ekstrakata koprive su ispitivana sa aspekta primene u terapiji različitih oblika artritisa. U Nemačkoj su registrovana dva preparata firme Atrathmann AG, Hamburg (Slika 2.23.): Rheuma-Hek® (IDS23 - etanolni ekstrakt herbe koprive) i Hox alpha® (IDS30 - kapsule koje sadrže ekstrakt herbe koprive), i sprovedena je serija istraživanja antiinflamatornog dejstva ovih preparata na životinjama ali i kroz otvorene kliničke studije na pacijentima-dobrovoljcima. Pored toga, izvršena su brojna, *in vitro* ispitivanja istih preparata u cilju definisanja mehanizma delovanja (Upton, 2013). Reumatoidni artritis je zapaljensko obolenje gde dolazi do inteziviranih inflamatornih procesa u zglobovima, tačnije sinovijalnoj membrani. Taj proces je posredovan povećanom produkcijom proinflamatornih citoina (najčešće TNF α i IL-1 β), zatim širenjem i stvaranjem novih krvnih sudova, lokalnog nagomilavanja ćelija što dovodni do formiranja otoka i na kraju stvaranja tzv. granulacionog tkiva (panusa) i trajnog oštećenja zgloba (Stefanović, 2000).



Slika 2.23. Registrovani preparati na bazi herbe koprive (Atrathmann AG, Hamburg).

Ne postoji nijedna zvanična klinička studija o efikasnosti ovih ili bilo kog drugog preparata na bazi herbe koprive. Međutim, sprovedena su brojna istraživanja koja uključuju pacijente-dobrovoljce koji su koristili ovoj preparat. U slučaju pacijenata obolelih od osteoartritisa kuka i kolena (219 pacijenata), stanje se poboljšalo kod čak 70 % ispitanika, nakon uzimanja 1340 mg IDS23 preparata u toku 3 nedelje (Hansen, 1996). Isti uslovi tretmana su sprovedeni na mnogo većem broju pacijenata (8955 pacijenata) obolelih od osteoartritisa i u 55% slučajeva smanjen je bol u toku mirovanja, 45% bol pri kretanju i kod 38% poboljšano generalno fizičko stanje (Ramm i Hansen, 1997). Slična istraživanja su sproveli i Wolf i saradnici (2001) i Hubbe (2002) pri čemu su u oko 50% slučajeva pacijenti bili zadovoljni tretmanom i imali olakšane tegobe osteoartritisa. Primenom kombinacije diklofenaka sa prokuvanim ekstraktom herbe koprive kod pacijenata sa akutnim artritismom, Chrubasik i saradnici (1997) su postigli postigli da se smanje tegobe pacijenata te su zaključili da primenjeni ekstrakt koprive povećava antireumatsko dejstvo samog leka. Randal je u seriji istraživanja (Randal i sar, 1999; Randal i sar, 2000; Randal i sar, 2008) potvrdio efikasnost eksterne primene herbe koprive kod artritisa. U svim slučajevima apliciranjem sveže biljke na oboleli zglob, pacijenti su osećali olakšanje i nakon više dana terapije, smanjio se otok i povećala pokretljivost zgloba. Uticaj preparata koprive IDS30 ispitivan je na miševima sa zapaljenjem creva (ulceroznim kolitismom). Kod grupe koja je dobijala IDS30 primećeno je znatno smanjenje nivoa TNF α i IL-1 β kao i smanjena proliferacija monocita izazvana LPS-om (Konrad i sar, 2005). Kod pacova sa

indukovanim artritismom, nakon intraperitonealne administracije IDS23 (300 mg/kg) došlo je do smanjenja obima šape, i to 67% u odnosu na diklofenak (Strathmann GmbH - podaci proizvođača).

U cilju definisanja mehanizma antiartritisnog delovanja ekstrakata koprive sprovedena su istraživanja *in vitro*. Registrovan preparat koprive - IDS23, smanjuje COX-zavisnu (i samo delimično LOX-zavisnu) produkciju prostaglandina (PGD₂ i PGF₂) kao i LPS-indukovanu produkciju proinflatornih citokina TNF α i IL-1 β . Za inhibiciju COX puta među najzaslužnijim komponentama ekstrakta se smatra kafeoil-jabučna kiselina, dok na inhibiciju produkcije citokina nisu uticali ni jedna od dominantnijih komponenti ekstrakta (kafeoil-jabučna, kafena ni hlorogenska kiselina, kao ni rutin i kvercetin) ukazujući da su druge komponente zaslužne za datu aktivnost (Obertreis i sar, 1996a, Obertreis i sar, 1996b). Na molekulskom nivou, ekstrakt IDS23 smanjuje produkciju pomenutih citokina tako što dozno-zavisno inhibira degradaciju I κ B-a te sprečava translokaciju NF- κ B faktora u jedro (Riehemann i sar, 1999). Ekstrakt IDS23 smanjuje produkciju IL-2 i INF- γ od strane Th1 ćelija ali povećava Th2 specifičnu sekreciju IL-4 (Klingelhofer i sar, 1999). Dendritske ćelije (DC) predstavljaju važne antigen prezentujuće ćelije i njihova maturacija i aktivacija T-ćelija predstavlja važan korak u inicijaciji reumatoidnog artritisa. Preparat na bazi koprive IDS30 smanjuje maturaciju humanih dendritskih ćelija i sprečava DC-posredovanu aktivaciju T-limfocita (Broer i Behnke, 2002). Isti preparat smanjuje IL-1 β indukovanu ekspresiju matriksne metaloproteinaze-1 (intestinalne kolagenaze), matriksne metaloproteinaze-3 (stromelizin-1) i matriksne metaloproteinaze-9 (želatinaze B) u humanim hondrocitima (Schulze-Tanzil i sar, 2002).

Uticaj ekstrakta herbe koprive (IDS23) na produkciju citokina ispitan je i na zdravim dobrovoljcima pri čemu, u bazalnim uslovima ekstrakt nije menjao nivo citokina (TNF α , IL-1 β , IL-4, IL-6 i IL-10) ali nakon LPS-stimulacije, smanjena je produkcija proinflatornih TNF α i IL-1 β kod pacijenata koji su uzimali IDS23 (Teucher i sar, 1996). Isto istraživanje je sprovedeno na pacijentima obolelim od reumatoidnog artritisa i rezultati su bili u saglasnosti sa prethodnim - primenom IDS23 došlo je do dozno-zavisnog smanjenja nivoa TNF α i IL-1 α u odnosu na kontrolu (Pearce i sar, 1999).

Evidentni su brojni dokazi antiinflatornog delovanja preparata na bazi ekstrakata herbe koprive i opravdana je njihova primena kao pomoćnog sredstva u terapijama razlih oblika artritisa. Svakako najvažniji rezultati su poboljšanje stanja pacijenata, olakšanje tegoba, smanjenje otoka i povećanje pokretljivosti bolnih zglobova nakon primene preparata na bazi koprive ili apliciranja same sveže biljke na bolno mesto. Dodatna *in vitro* istraživanja daju uvid u dejstvo ovih preparata na molekulskom nivou - smanjuju upalne procese tako što inhibiraju maturaciju dendritskih ćelija, smanjuju produkciju proinflatornih citokina i ekspresiju matriksnih metaloproteinaza.

Inhibicija agregacije trombocita - vodeni i metanolni ekstrakti herbe koprive su pokazali slabu inhibiciju agregacije trombocita, međutim, kada su primenjeni lipofilniji ekstrakti, inhibicija agregacije je bila efikasnija (etilacetatni ekstrakt, 77% inhibicije pri 1 mg/mL). Komponente ekstrakta zaslužne za anti-agregacioni efekat su flavonoidi (Mekhfi i sar, 2004; Goun i sar, 2002; Sajid i sar, 1991; El Haouari i sar, 2006). Suprotno ovim rezultatima, Antonopoulou i saradnici (1996) su odredili da fosfolipidna frakcija ekstrakata lista, herbe i korena koprive stimulše agregaciju trombocita istim mehanizmom kao PAF ali pet puta slabijeg intenziteta.

Analgetski efekat - u nekoliko istraživanja na eksperimentalnim životinjama potvrđeno je analgetsko dejstvo vodenih i metanolnih ekstrakata herbe koprive, pre svega u testovima tolerancije toplote (Lasheras i sar, 1986; Mahmoudi i sar, 2007; Gulcin i sar, 2004).

Antioksidantno delovanje

Antioksidantna svojstva ekstrakata herbe koprive su dokazana brojnim istraživanjima u *in vivo* i *in vitro* sistemima. Etanolni ekstrakt herbe koprive je povećava aktivnost enzima antioksidantne zaštite:

citohrom b5, NADH-citohrom b5 reduktaze, glutation S-transferaze, DT-diaforaze, glutation peroksidaze, glutation reduktaze, superoksid dismutaze i katalaze (Ozen i Korkmaz, 2003). Toldy i saradnici (2005) su otkrili da kopriva kao dodatak ishrani smanjuje akumulaciju slobodnih elektrona u mozgu i stimuliše vezivanje aktivatornog proteina 1 za DNA te zaključili da je ona efikasan antioksidant i potencijalni anti-apoptotički agens koji promoviše preživljavanje moždanih ćelija. Kod pacova izloženih ishemiji a koji su uzimali vodeni rastvor lista koprive, izmeren je nizi nivo MDA (malonil-dialdehida) kao markera ishemijskog oštećenja (Cetinus i sar, 2005). Čaj od koprive je značajno smanjio oštećenja tkiva pacova tretiranih sa TCA (trihlor sirćetna kiselina), smanjivši serumske nivoe transaminaza, katalaze u jetri i superoksid dismutaze u mozgu (Celik i Tuluze, 2007). Ulje od semena koprive smanjilo je oksidativna oštećenja kod pacova izazvana CCl₄ (Kanter i sar, 2004).

U *in vitro* eksperimentima potvrđeno je da ekstrakti koprive smanjuju lipidnu peroksidaciju, imaju visok redukcionu kapacitet, neutrališu hidroksil radikal, smanjuju generisanje superoksid anjon radikala, smanjuju LPS-indukovanu produkciju NO[•] radikala od strane makrofaga helatiraju jone gvožđa i bakra (Pieroni i sar, 2002; Gulcin i sar, 2004; Mavi i sar, 2004; Katalinic i sar, 2006; Harput i sar, 2005).

Diuretski efekat

Upotreba različitih infuza i čajeva od koprive kao diuretika jedna je od najranijih primena ove biljke. Njeno diuretsko dejstvo je potvrđeno i brojnim naučnim istraživanjima na eksperimentalnim životinjama. Primenom koprive (dekokta, etanolnih ekstrakata, sveže ceđenog soka od lista koprive, kapsula koje sadrže suvi ostatak ekstrakta koprive) kod pacova zabeležen je porast ekskrecije urina, što je praćeno povećanom ekskrecijom natrijuma, kalijuma i hlorida (Carceres i sar, 1987; Frank i sar, 1998; Tita i sar, 1993). Wantoch (1935) je primetio diuretski efekat dekokta koprive kod pacijenata sa srčanom insuficijencijom i zabeležio da se nakon uzimanja 200 mL dekokta (5g prokuvano u 200 mL u toku 5 min) povećala ekskrecija urina kod pacijenata sa 1000 na 1800 mL u toku 24h.

Kao prateći efekat diureze uzrokovane koprivom, javlja je i hipotenzivni efekat, mada su rezultati dobijeni u naučnim istraživanjima na ovu temu prilično neusaglašeni. Intravenoznom aplikacijom vodenog ekstrakta herbe koprive pacovima, smanjen je krvni pritisak za oko 15 %, i povećana je natriureza i diureza (Tahri i sar, 2000). Etanolni ekstrakt koprive je imao vazodilatatorni efekat kod zečeva ali je primećen i porast sistolnog pritiska (Ludwig, 1945). U nekoliko istraživanja, nakon intravenozne aplikacije ekstrakta koprive, primećen je pad krvnog pritiska kod zečeva i pacova ali veoma prolazan te se smatra posledicom anestetičkog dejstva ekstrakta (Keeser, 1940; Lasheras i sar, 1986; Tita i sar, 1993). Značajan hipotenzivni efekat, praćen bradikardijom je zabeležen kod mačaka nakon uzimanja vodenog ekstrakta koprive. Pošto je ovaj efekat koprive bio sličan efektu dihidroergotamina, autori su zaključili da kopriva ispoljava hipotenzivni efekat preko adrenergičnog sistema (Broncano i sar, 1983). Jedina studija na pacijentima sprovedena je 1983 od strane Kirchhoff-a, gde su pacijenti dovijali sveže ceđen sok od lista koprive u toku 2 nedelje. Primećen je porast volumena urina, smanjenje edema i telesne težine kao i blagi pad sistolnog pritiska, dok su diastolni pritisak i serumski elektroliti ostali nepromenjeni.

Antidijabetsko dejstvo

Postoje podaci koji ukazuju da ekstrakti herbe koprive mogu imati uticaj na nivo glukoze u krvi. Međutim, podaci studija na eksperimentalnim životinjama su nedosledni što može biti posledica različitih doza, modova aplikacije ili samog dizajna eksperimenta. Prema istraživanjima Haznagy (1943) i Farzami i saradnika (2003), zabeležen je hipoglikemijski efekat vodenog ekstrakta koprive – smanjuje nivo glukoze u krvi za 30% i povećava nivo insulina u krvi. Međutim, u drugim studijama nije zabeležen nikakav uticaj na nivo glukoze u krvi niti hipoglikemijski efekat (Gunes i sar, 1999; Keeser, 1940; Ludwig, 1945;

Tabela 2.5. Ostala farmakološka dejstva herbi koprive (*Urticae herba*)

	Ekstrakt	Rezultati testa	Referenca
Hemopreventivni i imunomodulatorni efekat	95%-ni etanolni ekstrakt	Inhibicija aktivacije EBV-EA virusa	Karpadia i sar, 2002
	Vodeni ekstrakt	Stimulacija proliferacije T-limfocita u slezini miševa	Harput i sar, 2005
Centralni nervni sistem	Vodeni ekstrakt	Sedativni efekat na miševima u toku 16h	Lasheras i sar, 1986
	Vodeni ekstrakt	Snižava aktivnost i telesnu temperaturu glodara	Broncano i sar, 1987b
	Vodeni ekstrakt	Inhibicija proteazne aktivnosti lakog lanca A botulin toksina	Gul i sar, 2004
Kardiovaskularna aktivnost i dejstvo na glatku muskulaturu	Vodeni ekstrakt	Pozitivan inotropni i negativan hronotropni efekat na izolovano srce i aortu Langedorff pacova	Legssyer i sar, 2002
	Vodeni ekstrakt	Inhibicija kontrakcije uterusa pacova	Broncano i sar, 1987a
Gastrointestinalna aktivnost	Zakišeljani vodeni ekstrakt	Povećava lučenje želudačnog i pankreasnog soka	Dobreff i sar, 1924
	Vodeni ekstrakt	Smanjuje oštećenja gastrične mukoze izazvane etanolom	Gulcin i sar, 2004
Hepatoprotektivno dejstvo	Ulje od semena koprive	Sprečava CCl ₄ -indukovano oštećenje jetra u pacovima	Turkdogan i sar, 2003 Kanter i sar, 2003
Hipolipidemijski efekat	Vodeni i petroletarski ekstrakti	Smanjuju nivoe holesterola, LDL-a i apolipoproteina A u krvi	Daher i sar, 2006
	Vodeni ekstrakt	Smanjuje nivo LDL-a a povećava nivo HDL-a u serumu	Avci i sar, 2006
	Etanolni ekstrakt	Aktivira PPAR (<i>peroxisome proliferator-activated receptors</i>)	Rau i sar, 2006
Efekat u tretmanu anemie	Sok od koprive	Stimuliše eritropoezu i neutrališe anemiju nakon 20 dana (izazvanu namernim puštanjem krvi kod zečeva)	Cremer, 1934
Antimikrobna i antiviralna aktivnost	Dietilacetatni ekstrakt	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> i <i>Escherichia coli</i>	Brantner i sar, 1994, Keles i sar, 2001
	Vodeni ekstrakt	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Citrobacter koseri</i> , <i>S. aureus</i> i <i>S. epidermis</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>E. coli</i> i <i>Candida albicans</i>	Gulcin i sar, 2004
	Vodeni ekstrakt	<i>Paramecium primaurelia</i> i <i>Lepidium sativum</i>	Oswiecimska i sar, 1980
	Vodeni ekstrakt	<i>S. pyogenes</i> , <i>S. aureus</i> i <i>S. epidermidis</i>	Turker i Usta, 2008

Swanston-Flatt, i sar, 1989; Neef i sar, 1995; Roman-Ramos i sar, 1992). U prilog hipoglikemijskom efektu idu *in vitro* istraživanja u kojima je ekstrakt koprive ispoljio inhibiciju intestinalne glukozidaze i time smanjio apsorpciju glukoze iz hrane (Bnouham i sar, 2003; Onal i sar, 2005). Dalja istraživanja na ovu temu su neophodna da bi se mogao doneti definitivni zaključak kako i da li herba koprive utiče na nivo glukoze u krvi.

Ostala farmakološka dejstva

Pored prethodno navedenih, moglo bi se reći, glavnih farmakoloških dejstava herbe koprive, potvrđeni su i broji drugi efekti, dati u *tabeli 2.5*

Kontaktna urtikarija

Kontaktna urtikarija predstavlja reakciju organizma nakon fizičkog kontakta sa svežom biljkom koprive, tačnije, nastaje nakon kontakta kože sa žarnim dlakama koje se nalaze na listovima i stabljici ove biljke (*Slika 2.24.*). Žarne dlake pucaju pri kontaktu i injektuju svoj sadržaj pod kožu berača i izazivaju veoma neprijatan osećaj tzv. žarenja. Prva komponenta koja je identifikovana u žarnim dlakama bio je 5-hidroksitriptamin tj. serotonin (Collier i Chesher, 1956; Vialli i sar, 1973). Pored serotonina, identifikovan je i histamin kao dominantna komponenta žarnih dlaka (Vialli i sar, 1973). U homogenatima lista koprive, nađena je visoka količina acetilholina, kao i visoka aktivnost enzima holin acetiltransferaze (Barlow i Dixon, 1973; Smallman i Maneckjee, 1981). Koncentracije ovih komponenti u žarnim dlakama (ŽD) izmerili su Frank i saradnici (1998) i one iznose: za serotonin 5 ng po ŽD, 0,2 mg/kg svežeg lista, histamin 10 mg po ŽD, 30 mg/kg svežeg lista i acetilholin 0,1-0,2 g po ŽD, 20 mg/kg svežeg lista.



<http://pioneerthinking.com/beauty/files/2014/05/Nettle.jpg>



<http://wildearthfineart.com/wp-content/uploads/2012/07/W5E5782-567x400.jpg>

Slika 2.24. Izgled žarnih dlaka na površini lista (levo) i stabljike (desno) koprive.

Nanošenjem 50%-nog etanolnog ekstrakta koprive na kožu, ne dolazi ni do kakve reakcije iritacije što kazuje da se u toku ekstrakcije pomenute komponente žarnih dlaka razgrađuju (Ludwig, 1945). Međutim, kada je isti ekstrakt ubrizgan ispod kože ili lokalnom aplikacijom na ranu na koži, rezultovalo je simptomima sličnim urtikariji koju izaziva sveža biljka (Starkenstein i Wasserstrom, 1933). Da su za simptome urtikarije zaslužne komponente žarnih dlaka - histamin i acetilholin - potvrdili su Emmelin i Feldberg (1947) kada su aplicirali kombinaciju tih komponenti u koncentraciji u kojoj su prisutni u žarnim dlakama na kožu i pri tom izazvali identične vaskularne promene i neprijatan bol. Ekstrakt samih žarnih dlaka (oko 15 ŽD po inkubaciji) nije izazvao nikakvu reakciju otpuštanja histamina iz mastocita *in vitro*, ukazujući da je za efekat urtikarije zaslužan histamin iz samih žarnih dlaka (Oliver i sar, 1991). Kao medijatori inflamatorne reakcije urtikarije potvrđeni su u leukotrijeni B₄ i C₄ (Collier i Chesher, 1956; Czarnetzki i sar, 1990). Utvrđeno je da su ćelijski medijatori efekta urtikarije mastociti, za razliku od ostalih mono- i polinuklearnih ćelija čija se koncentracija ne menja. Mastociti aktivirani urtikarijom pokazuju znake degranulacije 5 minuta nakon kontakta. Nakon 12h, mastociti formiraju kontakte sa dendritskim ćelijama i limfocitima, šireći imflamaciju (Oliver i sar, 1991).

2.4.2. *Urticae radix* (koren koprive)

Ekstrakt korena koprive je našao svoju primenu u ublažavanju tegoba nastalih usled benigne hiperplazije prostate (BHP). Registrovan je velik broj preparata na bazi korena koprive (Tabela 2.6.) koji se koriste kao pomoćna sredstva u terapiji ove bolesti. Sama hiperplazija prostate predstavlja uvećanje organa usled povećanja broja epitelnih i vezivnih ćelija. Glavna tegoba jeste otežano mokrenje jer uvećana prostata pritiska mokraćni kanal, međutim, ovo stanje ne vodi formiranju tumora ili kancera. Uvećanje prostate dovodi do povećane koncentracije specifičnog prostatičnog antigena (PSA) u cirkulaciji. Sprovedena su brojna *in vitro* istraživanja u cilju identifikacije aktivnih komponenti korena koprive i definisanja mehanizma delovanja. Takođe, sprovedene su brojne kliničke studije ali uglavnom otvorenog i nekontrolisanog tipa.

Tabela 2.6. Lista preparata na bazi korena koprive kao pomoćna sredstva u terapiji BHP.

Ime preparata	Forma	Rastvarač	Proizvođač
Urtica plus	Kapsule	70 % etanol	Osterholz/Schwarzpharma
Urtica plus N	Kapsule	70 % etanol	Osterholz/Schwarzpharma
Bazoton (BAZ)	Kapsule	20 % metanol	Kanoldt/Abbott
Bazoton Liquidum	Rastvor	16 % etanol	Kanoldt
Bazoton N	Kapsule	20 % metanol	Kanoldt
Bazoton uno	Tablete	20 % metanol	Kanoldt
Prostaherb N	Dražetje	20 % metanol	Cesra
ZY15095	Kapsule	20 % metanol	Zyma/Novartis
Urtica-APS	Tablete	60 % etanol	Zyma/Novartis
Winar (LI 166)	Tablete	60 % etanol	Lichtwer
Prosta-Truw	Kapsule	40 % etanol	Truw
Prostatin	Tablete	20 % metanol	Abbott
Prostaherb	Tablete	20 % etanol	Cesra

Uticao na aktivnost aromataze

Aromataza predstavlja ključni enzim u metabolizmu steroidnih hormona jer vrši konverziju androgena u estrogene te se njenom inhibicijom može povećati nivo androgena. Etanolni ekstrakt korena koprive je inhibirao aromatizaciju androstendiona *in vitro* ($IC_{50} = 338$ mg/ml) pri čemu je inhibicija bila efikasnija dodatkom ekstrakta *Serenoa repens* (patuljaste palme). Smatra se da su za inhibiciju zaslužne lipofilne komponente jer je heptanska frakcija ekstrakta bila najaktivnija (Koch, 1995). U sličnom eksperimentu, poređena je aktivnost ekstrakta sa sintetičkim inhibitorom aromataze, pri čemu je za postizanje iste inhibicije koncentracija ekstrakta morala biti čak 250 puta veća (Morgenstern i Ziska, 1999). Slično prvom eksperimentu, dozno-zavisna inhibicija aromataze je bila efikasnija kada se metanolni ekstrakt korena koprive mešao sa ekstraktom vrste *Pygeum africanum* (Hartmann i sar, 1996).

Komponente ekstrakta korena koprive koje inhibiraju aromatazu su: pored uobičajenih masnih kiselina i (10E, 12Z)-9-hidroksi-10,12-oktadekanska kiselina (Kraus i sar, 1991), lignani (sekoizolaricrezinol), oleanolna, ursolna, (9Z,10E)-13-hidroksi-9,11-oktadekanska kiselina i 14-oktakosanol su identifikovani kao slabiji inhibitori ovog enzima (Gansser i Spitteller, 1995a). Bartsch i Kuhne (1992) su potvrdili sposobnost nekoliko komercijalnih preparata na bazi korena koprive da inhibiraju aromatazu, kao i izolovane komponente 9-hidroksi-10-trans-12-cis-oktadekadienska kiselina i njen derivat 9-okso-10-trans-12-cis-oktadekadienska kiselina. Međutim, ove komponente su prisutne u korenu koprive u niskim koncentracijama da bi se inhibicija aromataze mogla pripisati isključivo njima.

Predložen je još jedan mehanizam smanjenja aktivnosti enzima zbog inhibicije ekspresije gena koji kodiraju aromatazu dejstvom komponenti iz vodenog ekstrakta korena koprive (Jarry i sar, 1999).

Antiinflamatorna aktivnost

Uvećanjem prostate, opstruirani mokraćni kanal i bešika postaju podložniji zapaljenskim procesima te je ispitan uticaj preparata korena koprive na upalne procese. Preparat Bazoton (sadrži 1,7% polisaharida), kao i frakcija ekstrakta bogata polisaharidima, inhibiraju alternativni put aktivacije komplementa te na taj način mogu doprineti smirivanju upalnih procesa (Willer, 1992; Wagner i sar, 1994). Etanolni ekstrakt korena koprive inhibira aktivnost leukocitne elastaze (Koch i sar, 1995). Preparat LI166 je pokazao antiinflamatorno dejstvo na pacovima (eng. *carrageenan-induced paw oedema test*). Međutim, potrebno je dodatno utvrditi da li ovi efekti značajnije doprinose anti-prostatičnom dejstvu korena koprive (Morgenstern i Ziska, 1999).

Uticaj na polne hormone i njihove vezujuće proteine-transportere

Kod osoba sa BHP-om nije detektovan povećan nivo testosterona u cirkulaciji već je ključna konverzija testosterona do dihidroksi testosterona (DHT) dejstvom enzima 5α -reduktaze. Ovaj korak predstavlja jedan od glavnih okidača uvećanja prostate. Enzim 5α -reduktaza je lokalizovan u ćelijama vezivnog tkiva prostate koje predstavljaju glavna mesta sinteze DHT-a. Takođe, bitnu ulogu u procesu uvećanja prostate ima i SHBG (eng. *sex hormone binding globulin*) koji "doprema" testosteron do ćelija prostate.

Vodeni (ali ne i etanolni) ekstrakt korena koprive je inhibirao u dozno-zavisnom maniru vezivanje SHBG-a za svoje receptore na membranama humanih ćelija prostate (Hryb i sar, 1995). Komponente ekstrakta koje smanjuju sposobnost SHBG-a da veže polne hormone su lignani (sekoizolaricirezinol, neoolivil, dehidrodikoniferil alkohol, izolaricirezinol, matairezolinol), njihovi derivati i metaboliti (3,4-divanililtetrahidrofuran, enterodio i enterolakton) ali i smeša derivata masnih kiselina koja je nakon izvršene metilacije pokazala veću efikasnost, dok komponente izolovane iz ekstrakta (UDA, lektin i stigma-4-en-3-on) nisu pokazale nikakav efekat (Gansser i Spiteller, 1995b; Hryb i sar, 1995; Schottner i sar, 1997). Mogu se pretpostaviti dva mehanizma delovanja ovih komponenti: interakcija sa slobodnim steroidnim hormonima u krvi i sprečavanje njihovog vezivanja za SHBG ili prevencija vezivanja SHBG-a za njegove receptore u prostati (Schmidt, 1983). Preparat Bazoton nije pokazao nikakav uticaj na vezivanje DHT-a za androgene receptore na prostati pacova (Rhodes i sar, 1993). Rezultati o uticaju ekstrakata korena koprive na aktivnost 5α -reduktaze su nedosledni. Prema Hartmann-u i saradnicima (1996) metanolni ekstrakt inhibira ovaj enzim ($ED_{50} = 14,7$ mg/ml) dok Rhodes i saradnici (1993) ukazuju da je ova aktivnost veoma slaba u poređenju sa aktivnošću sintetičkog inhibitora finasterida. Dodatno, etanolni ekstrakt nema uticaja na konverziju testosterona u DHT (Koch i Biber, 1994). U nešto skorijem istraživanju, potvrđeno je da petroletarski i etanolni ekstrakti korena koprive deluju anti-prostatično kod pacova sa testosteronom-izazvanom hiperplazijom. Nakon tretmana od 28 dana, ova dva ekstrakta su dovela do smanjenja aktivnosti 5α -reduktaze i nivoa PSA, kao i do povećanja ekskrecije urina (Nahata i Dixit, 2012).

Prema kliničkim studijama na pacijentima primećeno je značajno smanjenje SHBG-a u toku primene preparata Bazoton. Što se tiče uticaja na ostale hormone, rezultati su opet nedosledni. Prema Fischer-u i Wilbert-u (1992) zabeležen je 10%-ni porast testosterona, 5α -DHT-a i estradiola dok prema Vontobel-u i saradnicima (1985) nivoi testosterona, androstandiola i kisele fosfataze ostaju nepromenjeni. U drugim otvorenim studijama uticaj ekstrakta korena koprive na polne hormone (SHBG, DHT, testosteron) nije bio dosledan te su predloženi estradiol i estron kao mete delovanja (Frick i Aulitzky, 1987; Bauer i sar, 1988; Huber i sar, 1992).

Uticaj na rast ćelija prostate

Glavni razlog uvećanja prostate jeste povećanje broja ćelija kako vezivnih tako i epitelnih, te je u više navrata ispitivan uticaj ekstrakata korena koprive na proliferaciju ćelija prostate. Na nekoliko modela ćelijskih linija (fibroblati prostate pacova, humane ćelije prostate, epitelne ćelije prostate) dejstvo ekstrakata korena koprive je smanjilo proliferaciju za oko 20-50% i koncentracije EGF (eng. *epidermal grow factor*) receptora, pri čemu je u većij meri smanjena proliferacija epitelnih ćelija u odnosu na vezivne (Schmitt, 1987; Enderle-Schmitt i sar, 1988; Rausch i sar, 1992, Konrad i sar, 2000). Koristeći humanu kanceranu ćelijsku liniju epiderma (A431) kao model jer ima povećanu ekspresiju EGF receptora, otkriveno je da UDG (Urtica dioica agglutinin) inhibira vezivanje EGF-a za njegov receptor (Wagner i sar, 1995). Izolovan enzim Na^+, K^+ -ATPaza iz ćelija prostate pacijenata sa BHP-om, je inhibiran dodatkom različitih ekstrakata korena koprive pri koncentraciji od 0,1 mg/mL. Enzim su inhibirale i steroidne komponente ekstrakta stigmast-4-en-3-on, stigmasterol i kampesterol (konc 10^{-3} - 10^{-6} M) ukazujući da mehanizam delovanja ekstrakata može biti supresija ćelijskog metabolizma i rasta preko interakcije sa membranskim proteinima (Hirano i sar, 1994).

Histološkim analizama praćene su promene na ćelijama prostate kod pacijenata koji su koristili preparate na bazi korena koprive (najčešće Bazoton). Nakon 9. nedelje promene su okarakterisane kao tretmanom-izazvana smrt glandularnih ćelija i prateća inflamacija (Streber, 1986). Nakon 20 nedelja, promene su kvalifikovane kao usporavanje ćelijskog metabolizma (Ziegler, 1982). Dok je nakon 6 meseci terapije primećeno zgušnjavanje sekretornih granula u citoplazmi i smanjenje lizozomalnih granula. Ovo ukazuje na povećanju sekreciju i smanjenu autolizu ćelija prostate (Oberholzer i sar, 1986). Nakon godinu dana tretmana, u glandularnim ćelijama je detektovana fluorescencija usled nakupljenih komponenti ekstrakta ili njihovih metabolita. Inkubacija tkiva BHP-a sa istim ekstraktom nije dovela do ove pojave (Dunyendorfer, 1984).

Kliničke studije

Prvi podaci o blagotvornom dejstvu ekstrakta korena koprive na pojavu uvećane prostate su zabeleženi još davne 1950 godine (Ruckle). Do danas je ispitano oko 40000 muškaraca (kroz 34 kliničke studije) sa ovim sindromom koji su kao pomoćno sredstvo koristili preparate na bazi korena koprive (Chrubasik i sar, 2007). Sumarno posmatrano, postoje dokazi koji idu u prilog da ovi preparati smanjuju tegobe BHP-a, međutim, da bi se mogla odrediti tačna doza i terapija potrebno je sprovesti dodatna istraživanja prateći uputstva WHO (World Health Organisation) i koncensus indeks (IPSS-*international prostate symptom score*) (Khoury i sar, 2000; Barry i sar, 1992). Ovo je neophodno da bi se ovi preparati uveli kao deo zvanične terapije. Međutim, sam ekstrakt korena koprive pomalo i gubi na značaju jer se kao mnogo efikasnija pokazala njegova mešavina sa ekstraktom patuljaste palme (Wilt i sar, 2000).

2.4.3. Farmakološko i alergeno dejstvo vrsta roda *Parietaria* L.

Vrste roda *Parietaria* su poznate u tradicionalnoj medicini, ali ipak njihova primena nije ni približno česta kao primena koprive. Ove vrste su mnogo poznatije kao jedne od najvažnijih uzročnika alergijskih reakcija, naročito u Mediteranskom području.

U tradicionalnoj medicini brojnih zemalja, upravo mediteranskog područja (Španija, Italija, Portugalija), ekstrakt vrste *Parietaria judaica* se koristi kod kardiovaskularnih tegoba (Akkerreta, 2009; Cavero i sar, 2011; Akkereta i sar, 2013). Dekokt *P. judaica*-e ima diuretska, antireumatska svojstva i koristi se kod genitalno-urinarnih infekcija (Cornara i sar, 2009). Infuzi iste biljke imaju deputativna i diuretska svojstva (Calvo i Cavero, 2014).

Dekokt lista vrste *Parietaria officinalis* se koristi kao diuretik i za ublažavanje gastrointestinalnih smetnji ali se u nekim ređim slučajevima koristi u tretmanu glavobolja i hipertenzije (Tuttolomondo i sar, 2014).

Polen vrsta roda *Parietaria* je jedan od glavnih uzročnika alergijskih reakcija (smatra se čak do 40%) u Mediteranskom području. Zbog toga su izvršena brojna istraživanja radi identifikacije čestica sa alergenim svojstvima i mehanizma samog alergijskog odgovora organizma. Polen *parietaria* sadrži minimum devet alergena od kojih su dva, nazvana, Par j 1 i Par j 2, najdominantniji i sa najizraženijim alergenim svojstvima. Zbog toga su izolovani i sekvencionirani, te je utvrđeno da je Par j 1 protein od 14.7 kDa i zaslužan je za 95% alergija izazvanih ovim polenom. Par j 2 je protein od 11.3 kDa i zaslužan je za 82% alergija izazvanih ovim polenom (Duro i sar, 1996; Duro i sar, 1997; Costa i sar, 1994). Oba proteina pripadaju familiji nespecifičnih lipid-transfernih proteina (Colombo i sar, 1998; Colombo i sar, 2003). Na ovim alergenima su identifikovane brojne epitope kojima vezuju IgE i izazivaju degranulaciju bazofila i mastocita te dolazi do alergijskog odgovora (Longo i sar, 2015). Pored ovih glavnih alergena, u polenu vrste *P. judaica* je identifikovan protein sličan himotripsinu koji ima serin proteaznu aktivnost. Iako sam ne izaziva alergijsku reakciju, smatra se da može dovesti do degradacije nekih neuropeptida što bi dovelo do upale disajnih puteva ili da može učestvovati mehanizmu penetracije alergena do pluća (Faro i sar, 1998). Dodatno, iz polena je izolovana još jedna peptidaza, okarakterisana kao aminopeptidaza koja je izazvala degradaciju okludina i E-kaderina kao i dezintegraciju ćelija epitela pluća A549. Ovo ukazuje da polen ovih vrsta, ne samo da izaziva alergijske reakcije već može narušiti integritet epitelne barijere pluća i dodatno pogoršati bronhokonstrikciju (Cortes i sar, 2006). U drugom eksperimentu, izlaganje ćelija epitela pluća A549 polenu *P. officinalis*, nije zabeležena dezintegracija ćelija već su primećene morfološke promene kao što su povećanje mikrovila na ćelijskoj membrani, povećanje multilamelarnih struktura i surfaktanta, kao i lizozomalnih enzima, što ukazuje na izlaganje ćelija polenu dovodi do aktivacije njihovih odbrambenih mehanizama (Esposito i sar, 2012). Interesantan je podatak da izoforma Par j 1 proteina (Par j 1.0101) ima sposobnost da veže LPS i na taj način ispoljava imunomodulatorno dejstvo ometajući imuni odgovor koji bi bio izazvan samim LPS-om (Bonura i sar, 2013).

Polen koprive, iako pripada istoj familiji kao i vrste roda *Parietaria*, ne pokazuje tako izražena alergena svojstva i uglavnom, su osobe alergične na jedan ili drugi polen. Ovo je i očekivano, s obzirom da poleni ovih vrsta (koprive i *Parietara*) nemaju mnogo sličnosti. S toga, ne može se očekivati nikakva unakrsna alergijska reakcija na polen vrsta koje pripadaju rodovima *Urtica* i *Parietaria* (Corbi i sar, 1985; Bousquet i sar, 1986).

3. Eksperimentalni deo

3.1. SPECIFIČNE HEMIKALIJE I REAGENSI KORIŠĆENI U EKSPERIMENTIMA

Najveći broj hemikalija je od proizvođača Sigma-Aldrich Chemicals (Steinheim, Germany) i to: acetilholinesteraza (C3389), antitela (anti-actina - A2066, anti-mouse - A4416, anti-rabbit - A9169), bicinoninska kiselina (BCA, B9643), 3,5-di-terc-butyl-4-hidroksitoluen (BHT), BSA (bovine serum albumin, P0914), 12(S)-hidroksi-(5Z,8E,10E)-heptadekatrien-kiselina (12-HHT), 12(S)-hidroksi-(5Z,8Z,10E,14Z)-eikozatetraen-kiselina (12-HETE), tromboksan B2 (TXB2), prostaglan E2 (PGE2), prostaglandin B2 (PGB2), kalcijumova jonofora A23187 (kalcimicin), tris[hidroksimetil]aminometan (TRIS), etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA), Triton X-100, hinska kiselina, katehin, 5-O-kafeoilhinska kiselina (klorogenska kiselina), galna kiselina, epikatehin, 2,5-dihidroksibenzoeva kiselina, p-hidroksibenzoeva kiselina, siringinska kiselina, p-kumarinska kiselina, umbeliferon, skopoletin, viteksin, sinapinska kiselina, o-kumarinska kiselina, miricetin, kvercitrin, 3,4-dimetoksicimetna kiselina, bajkalin, daidzein, kvercetin, cimeta kiselina, genistein, izoramnetin, bajkalein, amentoflavon, osnovni medijum Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetusni govedi serum (FBS - fetal bovine serum), L-glutamin, streptomycin, penicilin, amfotericin B, tripsin-EDTA rastvor (T4049), lipopolisaharid (LPS), interleukin-1b (IL-1b), inhibitori protein kinaza (Bay 11-7082, Wortmannin, SB203580, PD98059, SP600125), inhibitori proteaza (P8340). Folin-Ciocalteu (FC) reagens poručen je od Fisher Scientific (Leicestershire, UK). 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), 2-tiobarbiturna kiselina (TBA), sulfanilamid, vanilinska kiselina, ferulna kiselina, sekoizolaricirezinol, matairezinol, naringenin i rutin nabavljeni su od Fluka Chemie GmbH (Buchs, Switzerland). Trihlorsirćetna kiselina i D-glukoza monohidrat su poručeni od Lach-Ner sro (Neratovice, Czech Republic), natrijum-nitroprusid od Reanal (Budapest, Hungary), a N-(1-naftil)etilendiamin dihidrohlorid (NEDA) i askorbinska kiselina od Merck (Darmstadt, Germany). Tween-80 i svi korišćeni rastvarači kupljeni su od J. T. Baker (Deventer, Germany). Standardi kafena kiselina, luteolin i apigenin poručeni su od ChromaDex (Santa Ana, CA), a protokatehinska kiselina, epigalokatehin galat, eskuletin, hiperozid, kvercetin-3-O-glukozid, apiin, kemferol-3-O-glukozid, kemferol, krizoeriol, luteolin-7-O-glukozid i apigenin-7-O-glukozid od Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany). Laemli pufer za uzorke (Laemli sample buffer), standard obojenih proteina (161-0318) i pufer za elektroforezu (161-0772) su poručeni od BioRad Laboratories, Inc. (Hercules California, USA). Kit za određivanje aktivnosti enzima LDH je nabavljen od kompanije Spinreact (Girona, Spain). ELISA kitovi za određivanje citokina rat MCP1 (Cat.No. 555130), humanog MCP1 (Cat.No. 555179) i IL-8 (Cat.No. 555244) su poručeni od BD Biosciences (San Diego, USA) a za GROa (Cat.No. DY515) - RnD Systems (Minneapolis, USA) kao i antitela (anti-PCNA - 610665 i anti-rabbit - A9169). Od kompanije Santa Cruz Biotechnologies (Heidelberg, Germany) nabavljeni su reagensi za eksperiment utihnuća gena: Polybrene[®] (sc-134220), shRNA kontrola (sc-108080), shRNA MyD88 (sc-106986-V) i shRNA TLR4 (sc-156001-V), puromicin dihidrohlorid (sc-108071) i copGFP (sc-108084) kao i antitelo anti-villin (sc-28283). PVDF membrane (IPVH00010) su kupljene od kompanije Merck Millipore (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) a nitrocelulozna membrana (0,45 mm NC, No. 10600002) i film (Amersham Hyperfilm[™] ECL, 18x24 cm, 28906837) od kompanije GE Healthcare (Buckinghamshire, United Kingdom). ECL reagens (Plus-ECL NEL103001EA) je poručen od kompanije PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, USA). Razvijač (B/W negative developer, 100154) i fiksator (Superfix plus, 1027652) od kompanije Tetenal (Leicester, UK) a antitelo anti-COX-2 (160106) od kompanije Cayman Technologies (Pickerington, Ohio, USA).

3.2. BILJNI MATERIJAL I PRIPREMA EKSTRAKATA

Biljni materijal, korišćen za istraživanja u ovom radu, sakupljen je u periodu 2010–2013. godine i obuhvatao je predstavnike odabranih vrsta koje pripadaju rodovima *Urtica* i *Parietaria*. Većina biljnog materijala je sakupljena na području Republike Srbije, dok je vrsta *Parietaria judaica* karakteristična za mediteransko područje sakupljena u Crnoj Gori i Barseloni (Tabela 3.1.). Sakupljanje je vršeno u fazi cvetanja, materijal je determinisan od strane dr Gorana Anačkova i deponovan u herbarijumu Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu - BUNS Herbarium. U Tabeli 3.1. pored lokaliteta i vaučera, data je i oznaka kojom su uzorci označavani u rezultatima ovog rada datim u poglavlju 4. Biljni materijal je podeljen na herbu, koren, list, cvet i stabljiku i ostavljen da se osuši na vazduhu na sobnoj temperaturi. Nakon sušenja, biljni materijal je radi lakšeg deponovanja, usitnjen i čuvan u papirnim vrećama na suvom i tamnom mestu do momenta ekstrakcije. U slučaju eksperimenata na ćelijskim linijama nije data oznaka vrste sa lokalitetom ni varijetatom, već samo pun naziv vrste radi jednostavnijeg prikaza rezultata.

Tabela 3.1. Vaučeri deponovanog biljnog materijala korišćenog za analize, vreme sakupljanja, lokaliteti i oznake uzoraka korišćene u ovom radu.

Vaučer	Vrsta (podvrsta i varijetet)	Lokalitet	Vreme	Oznaka
2-1588	<i>Urtica dioica</i> L. 1753 subsp. <i>dioica</i> var. <i>pubescens</i> (Ledeb.) Trautv. 1855	Fruška Gora, put ka Zmajevcu	7.8.2010.	<i>U. dio1 (pub)</i>
2-1590	<i>Urtica dioica</i> L. 1753 subsp. <i>dioica</i> var. <i>pubescens</i> (Ledeb.) Trautv. 1855	Fruška Gora, put ka Zmajevcu	13.7.2011.	<i>U. dio3 (pub)</i>
2-1591	<i>Urtica dioica</i> L. 1753 subsp. <i>dioica</i> var. <i>pubescens</i> (Ledeb.) Trautv. 1855	Fruška Gora, Venac prema NS-u	13.7.2011.	<i>U. dio4 (pub)</i>
2-1592	<i>Urtica dioica</i> L. 1753 subsp. <i>dioica</i> var. <i>dioica</i>	Stara Planina, pored hotela	19.7.2011.	<i>U. dio5 (dio)</i>
2-1593	<i>Urtica dioica</i> L. 1753 subsp. <i>dioica</i> var. <i>pubescens</i> (Ledeb.) Trautv. 1855	Izlaz iz Crvenke (vinograd)	9.8.2011.	<i>U. dio6 (pub)</i>
2-1594	<i>Urtica dioica</i> L. 1753 subsp. <i>dioica</i> var. <i>dioica</i>	Vodovod - Kula	21.8.2011.	<i>U. dio7 (dio)</i>
2-1595	<i>Urtica dioica</i> L. 1753 subsp. <i>dioica</i> var. <i>pubescens</i> (Ledeb.) Trautv. 1855	Fruška Gora, put ka Zmajevcu	10.9.2011.	<i>U. dio8 (pub)</i>
2-1599	<i>Urtica kioviensis</i> Rogow. 1843	Zasavica, Zasavica II, obala reke	29.06.2013.	<i>U. kioviensis</i>
2-1582	<i>Parietaria officinalis</i> L. 1753	Stara Planina, Bigar potok, kod vodopada	17.7.2011.	<i>P. officinalis1</i>
2-1581	<i>Parietaria officinalis</i> L. 1753	Kanjon reke Jerme	22.7.2011.	<i>P. officinalis2</i>
2-1580	<i>Parietaria officinalis</i> L. 1753	Niš, klisura reke Jelašnice	28.5.2011.	<i>P. officinalis3</i>
2-1579	<i>Parietaria officinalis</i> L. 1753	Tara, Kanjon Dervente	5.6.2011.	<i>P. officinalis4</i>
2-1585	<i>Parietaria judaica</i> L. 1763 subsp. <i>judaica</i>	Crna Gora, Čanj, primorje	početak maja 2011.	<i>P. judaica1</i>
2-1584	<i>Parietaria judaica</i> L. 1763 subsp. <i>judaica</i>	Montžuk, Barselona	20.10.2011.	<i>P. judaica2</i>
2-1587	<i>Parietaria lusitanica</i> L. 1753 subsp. <i>lusitanica</i>	Kladovo, podvrška, Podvrška čuka	20. 7.2011.	<i>P. lusitanica1</i>
2-1583	<i>Parietaria lusitanica</i> L. 1753 subsp. <i>lusitanica</i>	park Guelj, Barselona	15.10.2011.	<i>P. lusitanica2</i>
2-1586	<i>Parietaria serbica</i> Pančić 1874	Niš, klisura reke Jelašnice	28.5.2011.	<i>P. serbica</i>

3.2.1. Metanolni ekstrakti

Metanolni biljni ekstrakti su pravljeni prelivanjem sprasenog biljnog materijala 80 % MeOH u vodi (približno 10 mL ekstragensa na 1 g biljnog materijala). Ekstrakcija maceracijom na sobnoj temperaturi, uz konstantno mućkanje je trajala 48 h, nakon toga su ekstrakti procedeni da bi se uklonio biljni materijal. Rastvarač je uparen do suva na vakuum uparivaču pri temperaturi do 45 °C a zatim dodatno sušeni u vakuum-eksikatoru, na sobnoj temperaturi, do konstantne mase. Dobijen suvi ostatak je rastvoren u dimetilsulfoksidu (DMSO) do koncentracije od 200 mg/mL. U slučaju ekstrakata herbi i lista, u cilju uklanjanja hlorofila i lipofilnih komponenti, suvi ostatak dobijen nakon uparavanja 80 %-nog MeOH je izmeren (radi računanja prinosa) i nakon toga rastvoren u toploj destilovanoj vodi i podvrgnut tečno-tečnoj ekstrakciji heksanom. Nakon toga, vodeni ekstrakt je uparen i suvi ostatak rekonstituisan u DMSO do koncentracije od 200 mg/mL. Detaljni podaci o masi biljnog materijala, suvog ekstrakta i prinosa su dati u *Tabeli 8.1.* u prilogu. U testovima obuhvaćenim ovim radom, analiziran je različit broj uzoraka, zavisno od složenosti samog testa i njegove ekonomičnosti (*Tabela 3.2.*). Kod većine spektrofotometrijskih metoda rađeni su uzorci sa svih lokaliteta podeljeni na herbu, koren i list, dok su za zahtevnije analize (kvantitativna tečnrohromatografska analiza i testovi na ćelijskim linijama) odabrani reprezentativni predstavnici svake vrste samo sa jednog lokaliteta.

Tabela 3.2. Spisak uzoraka korišćenih za različite analize (metanolni ekstrakti).

Analiza / test	Uzorak
Kvalitativna LC-MS/MS analiza	<i>U. dio1 (pub)</i> – herba i koren <i>U. kioviensis</i> – herba i koren <i>P. officinalis2</i> – herba i koren <i>P. judaica1</i> – herba i koren <i>P. lusitanica1</i> – herba i koren
Kvantitativna LC-MS/MS analiza	Uzorci sa svih lokaliteta (<i>Tabela 3.1.</i>) podeljeni na herbu, koren, list, stabljiku i cvet – 70 ekstrakata
Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola i flavonoida	Uzorci sa svih lokaliteta (<i>Tabela 3.1.</i>) podeljeni na herbu, koren i list – 47 ekstrakata
Testovi antioksidantne aktivnosti	Uzorci sa svih lokaliteta (<i>Tabela 3.1.</i>) podeljeni na herbu, koren i list – od 40 do 47 ekstrakata
Test antiinflamatorne aktivnosti	<i>U. dio1 (pub)</i> – herba i koren <i>U. dio6 (pub)</i> – herba i koren <i>U. kioviensis</i> – herba i koren <i>P. officinalis1</i> – herba i koren <i>P. officinalis2</i> – herba i koren <i>P. judaica1</i> – herba i koren <i>P. judaica2</i> – herba <i>P. lusitanica1</i> – herba
Test inhibicije enzima AChE	Uzorci sa svih lokaliteta (<i>Tabela 3.1.</i>) podeljeni na herbu i koren – 29 ekstrakata
Testovi na ćelijskim linijama IEC18 i Caco2	<i>U. dio1 (pub)</i> – herba i koren <i>P. officinalis2</i> – herba i koren <i>P. judaica1</i> – herba i koren <i>P. lusitanica1</i> – herba

3.2.2. Infuzi (vodeni ekstrakti)

Infuzi su pripremani prema klasičnoj recepturi za pripremanje čajeva: sprášeni biljni materijal (0,5 g, približno jedna mala kašika) je prelišen ključalom destilovanom vodom, mućkano u toku 10 minuta, a zatim procedeno radi uklanjanja biljnog materijala. Rastvarać je uparen do suva na vakum uparivaću pri temperaturi oko 50 °C a dobijeni suvi ostatak dodatno sušen u vakuum-eksikatoru, na sobnoj temperaturi, do konstantne mase. Suvi ostatak je rastvoren u DMSO : H₂O = 1:1, do koncentracije 50 mg/mL. Detaljni podaci o masi biljnog materijala, suvog ekstrakta i prinosa su dati u *Tabeli 8.2.* u prilogu. U *Tabeli 3.3.* dat je spisak infuza i testova u kojima su analizirani.

Tabela 3.3. Spisak infuza korišćenih za različite analize.

Analiza / test	Uzorak
Kvantitativna LC-MS/MS analiza	<i>U. dio1 (pub)</i> – herba, koren i list
	<i>U. dio6 (pub)</i> – herba
	<i>P. judaica1</i> – herba, koren i list
	<i>P. judaica2</i> – herba
	<i>P. officinalis2</i> – herba i list
Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola i flavonoida	<i>P. officinalis3</i> – herba i list
	<i>U. dio1 (pub)</i> – herba, koren i list
	<i>P. judaica1</i> – herba, koren i list
Testovi antioksidantne aktivnosti	<i>P. officinalis2</i> – herba i list
	<i>P. lusitanica1</i> – herba i list
	<i>U. dio1 (pub)</i> – herba
Test antiinflamatorne aktivnosti	<i>U. dio6 (pub)</i> – herba
	<i>P. officinalis1</i> – herba
	<i>P. officinalis2</i> – herba
	<i>P. judaica1</i> – herba
	<i>P. judaica2</i> – herba
	<i>P. lusitanica1</i> – herba

3.3. LC-DAD-MS i LC-MS/MS ANALIZA

Scan analiza

Određivanje hemijskog sastava ekstrakata rađeno je tehnikom tečne hromatografije kuplovane sa UV/VIS detekcijom (diode array detector, DAD) i tandemskom masenospektrometrijskom detekcijom. Korišćen je Agilent Technologies 1200 Series Rapid Resolution tećni hromatograf (sastavljen od G1379B vakuum-degazera, G1312B binarne pumpe, G1367C autosemplera, G1316B termostatanog odeljka za kolone i G1315C DAD detektora) kuplovan sa G6410A QqQ MS-MS detektorom sa elektrosprej (ESI) jonskim izvorom. Za kontrolu instrumenta i akviziciju podataka korišćen je MassHunter Workstation Data Acquisition ver. B.01.03 softver (Agilent Technologies).

Injektovano je 1–5 μL uzorka rastvorenog u smeši faza A i B (1:1). Kao mobilna faza A korišćena je 0,05 % V/V mravlja kiselina, a kao faza B – MeOH. Komponente su eluirane u gradijentnom režimu: 0 min 30 % B, 6 min 70 % B, 9 min 100 % B, 12 min 100 % B, post time 3 min (ukupno vreme analize 15 min), uz konstantan protok od 1 mL/min. Razdvajanje je postignuto na Rapid Resolution HT Zorbax Eclipse XDB-C18 50 mm \times 4,6 mm \times 1,8 μm koloni (Agilent Technologies) temperiranoj na 50 °C (eluat je nakon kolone hlađen na temperaturu detektora), ispred koje je bio vezan in-line filter (2 mm, 0,2 μm , Agilent Technologies). Praćen je UV/VIS signal eluata na 215 nm, 260 nm, 290 nm i 340 nm (za sve signale, širina trake bila je 16 nm), kao i kontinualni spektar u opsegu 190 –700 nm (sa korakom 2 nm).

Celokupna količina eluata prosleđena je u maseni spektrometar. Parametri jonskog izvora bili su: protok gasa za sušenje (N_2) 9 L/min, temperatura 350 °C, pritisak gasa za nebulizaciju 45 psi, napon na kapilari 4 kV. Za potrebe skrininga, svi uzorci analizirani su u MS2Scan modu (kvadrupol Q1 podešen na transmisiju, koliziona ćelija isključena, kvadrupol Q3 podešen na skeniranje), i u pozitivnom i u negativnom modu, uz m/z opseg 120–1000 Da (korak 0,1 Da) i vreme skeniranja 200 ms. Napon fragmentora podešen je na 100 V.

MSⁿ analiza

U cilju identifikacije pojedinačnih komponenti, odabrane jonske vrste u reprezentativnim uzorcima analizirane su korišćenjem MSⁿ tehnike Product Ion Scan (Q1 podešen na propuštanje samo odabrane jonske vrste – SIM, koliziona ćelija uključena, Q3 – skeniranje), uz kolizionu energiju variranu u opsegu 0–40 V (sa korakom 10 V), korišćen je za dobijanje MS² i pseudo-MSⁿ spektara.

Kvantitativna analiza

Odabrane fenolne komponente u ispitivanim ekstraktima kvantifikovane su primenom LC-MS/MS tehnike i korišćen je isti instrument kao i za kvalitativnu analizu.

Injektovano je po 5 μL uzorka razblaženog smešom faza A i B (1:1) do koncentracije u opsegu 0,2 - 2 mg/mL. Kao mobilna faza A korišćena je 0,05 % V/V mravlja kiselina a kao faza B – MeOH. Komponente su eluirane u gradijentnom režimu: 0 min 30 % B, 6 min 70 % B, 9 min 100 % B, 12 min 100 % B, post time 3 min (ukupno vreme analize 15 min), uz konstantan protok od 1 mL/min. Mešavina od 45 standarda je napravljena u seriji od 15 duplih razblaženja u opsegu 1,53 ng/mL do 25,0 \times 1000 ng/mL. Za njihovu analizu korišćen je kraći program: 0 min 30 % B, 6 min 70 % B, post time 2 min (ukupno vreme analize 8 min). Razdvajanje je postignuto na Rapid Resolution HT Zorbax Eclipse XDB-C18 50 mm \times 4,6 mm \times 1,8 μm koloni (Agilent Technologies) temperiranoj na 50 °C, ispred koje je bio vezan in-line filter (2 mm, 0,2 μm , Agilent Technologies). Celokupna količina eluata prosleđena je u maseni spektrometar. Parametri jonskog izvora bili su: protok gasa za sušenje (N_2) 9 L/min, temperatura 350 °C, pritisak gasa za nebulizaciju 40 psi, napon na kapilari 4 kV, negativni polaritet. Jedinjenja su praćena u SRM (eng. *selected reactions monitoring*) modu, međutim, zbog velikog broja pikova koji blisko eluiraju nije bilo moguće primeniti klasični SRM sa vremenskim segmentima, već dinamički, prateći svaku tranziciju/ion u intervalu od 1 min oko očekivanog retencionog vremena. Optimizovani parametri - tranzicije za svako praćeno jedinjenje, retencionna vremena, kao i naponi fragmentora i koliziona ćelije – za sva kvantifikovana jedinjenja su data u *Tabeli 3.4*. U toku analize, sniman je UV/VIS spektar u opsegu 200–600 nm, za dodatnu potvrdu identifikacije pikova (ukoliko je za tim bilo potrebe). Sama metoda primenjena za kvantitativnu analizu odabranih biljnih fenola je validovana i objavljena u radu Orčića i saradnika (2014).

Tabela 3.4. Optimizovani parametri dinamičkog MRM moda za kvantitaciju 45 fenola.

Jedinjenje	Prekursor <i>m/z</i>	Produkt <i>m/z</i>	$V_{\text{frag}}^{\text{a}}$ (V)	$V_{\text{coll}}^{\text{b}}$ (V)	t_{R} (min)	LD ^c ($\mu\text{g/mL}$)	LK ^d ($\mu\text{g/mL}$)
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	137	93	80	10	1.08	0.008	0.02
Cimetna kiselina	147	103	100	5	3.91	0.05	0.05
Protokatehinska kiselina	153	109	105	9	0.79	0.004	0.01
Gentizinska kiselina	153	109	100	9	1.03	0.004	0.02
Umbeliferon	161	133	120	19	1.73	0.006	0.01
<i>p</i> -kumarinska kiselina	163	119	90	9	1.69	0.01	0.02
<i>o</i> -kumarinska kiselina	163	119	100	5	2.62	0.006	0.01
Vanilinska kiselina	167	108	100	15	1.24	0.02	0.05
Galna kiselina	169	125	90	10	0.58	0.006	0.01
Eskuletin	177	133	105	15	1.13	0.001	0.004
Kafena kiselina	179	135	100	10	1.18	0.04	0.04
Hinska kiselina	191	85	150	20	0.52	0.02	0.03
Skopoletin	191	176	80	8	1.77	0.004	0.01
Ferulna kiselina	193	134	90	11	1.90	0.005	0.008
Siringinska kiselina	197	182	90	7	1.31	0.006	0.02
3,4-dimetoksicimetna kiselina	207	103	110	7	2.99	0.02	0.05
Sinapinska kiselina	223	193	100	17	1.92	0.006	0.03
Daidzein	253	208	145	31	3.43	0.01	0.03
Apigenin	269	117	130	25	4.71	0.4	0.8
Genistein	269	133	145	32	4.12	0.1	0.1
Bajkalein	269	269	165	0	5.15	0.8	2
Naringenin	271	151	130	16	3.87	0.01	0.03
Luteolin	285	133	135	25	4.03	2	2
Kemferol	285	285	130	0	4.55	0.8	0.8
Katehin	289	245	150	10	0.74	0.02	0.02
Epikatehin	289	245	150	10	0.95	0.02	0.08
Krizoeriol	299	284	125	20	4.82	0.2	0.2
Kvercetin	301	151	130	15	3.74	0.8	1
Izoramnetin	315	300	160	21	4.79	2	2
Miricetin	317	179	150	20	2.67	6	7
5- <i>O</i> -kafeoilhinska kiselina	353	191	100	10	0.80	0.4	0.4
Matairezinol	357	122	130	24	3.66	0.05	0.09
Sekoisolaricirezinol	361	165	130	26	2.90	0.05	0.07
Apigenin 7- <i>O</i> -glukozid	431	268	135	41	2.81	0.01	0.02
Viteksin	431	311	200	22	1.90	0.01	0.02
Baikalin	445	269	140	22	3.40	0.006	0.008
Kemferol 3- <i>O</i> -glukozid	447	284	190	30	2.80	0.004	0.007
Luteolin 7- <i>O</i> -glukozid	447	285	230	30	2.13	0.2	0.5
Kvercitrin	447	300	190	27	2.75	0.003	0.003
Epigalokatehin galat	457	169	165	16	0.81	0.8	0.8
Hiperozid	463	300	200	30	2.16	0.003	0.01
Kvercetin 3- <i>O</i> -glukozid	463	300	210	30	2.25	0.003	0.003
Amentoflavon	537	375	220	35	5.78	0.001	0.004
Apin	563	269	250	36	2.60	0.003	0.02
Rutin	609	300	135	42	2.33	0.1	0.1

$V_{\text{frag}}^{\text{a}}$ - napon fragmentora; $V_{\text{coll}}^{\text{b}}$ - kolizioni napon; LD^c – limit detekcije; LK^d - limit kvantitacije.

3.4. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA I FLAVONOIDA

Određivanje ukupnih fenolnih jedinjenja

Princip

Ukupni fenoli su određeni primenom FC (Folin-Ciocalteu's) reagensa koji predstavlja smešu heterofosfolframata-molibdata (Singleton i sar, 1999). U prisustvu fenola dolazi do jedno- ili dvoelektronske redukcije FC reagensa pri čemu rastvor dobija plavu boju čija se apsorbancija meri na 760 nm. Međutim, ovu redukciju mogu vršiti i mnoge, nefenolne komponente pa smatra da se ovom metodom određuje redukcionu kapacitet (Everette i sar, 2010).

Postupak

Pripremljena su razblaženja ekstrakata (po tri koncentracije u opsegu 0,05–1,6 mg/mL za metanolne i 0,31–1,25 mg/mL za vodene ekstrakte) u 50%-nom MeOH. U slučaju radnih proba, po 30 μ L ekstrakta je odmereno u mikroploče (96 polja) i dodato 150 μ L FC reagensa (0,1 mol/L). U korekcije je umesto FC reagensa dodato 150 μ L destilovane vode. Probe su inkubirane 6 minuta na sobnoj temperaturi a zatim je u sve dodato po 120 μ L Na_2CO_3 (75 g/L). Sve radne probe su rađene u tri ponavljanja a korekcije u jednom. Za konstruisanje kalibracione krive napravljena je serija razblaženja galne kiseline u opsegu 1,41 - 110,4 μ g/mL i analizirana isto kao i ekstrakti. Nakon 2h inkubacije na sobnoj temperaturi, očitana je apsorbancija na 760 nm talasne dužine pomoću Multiskan Spectrum čitača mikroploča (Thermo Corporation).

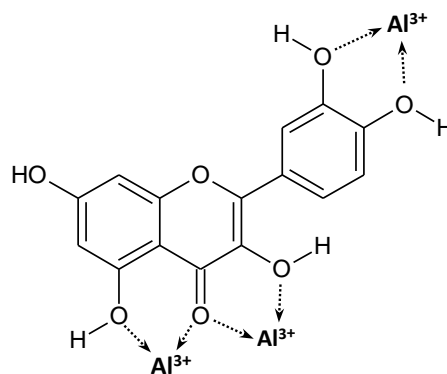
Izračunavanje

Sa kalibracione krive je očitana koncentracija galne kiseline koja odgovara apsorbancijama svake probe nakon oduzimanja apsorbancije korekcije. Dobijene vrednosti koncentracije galne kiseline (μ g/mL) su preračunate na masu suvog ekstrakta (mg/g). Konačni rezultati su izraženi kao mg ekvivalenata galne kiseline po 1 g suvog ekstrakta (mg eqGA/g SE) dati kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija.

Određivanje ukupnih flavonoida

Princip

Metoda se zasniva na osobini flavonoida da kompleksiraju jone metala (jone Al^{3+}) pri čemu dolazi do pomeranja UV i VIS apsorpcionih traka ka višim talasnim dužinama (batohromni efekat) tj. boja rastvora prelazi iz žute u žuto-zelenu. Smatra se da je ovo pomeranje uzrokovano formiranjem novog prstena (favorizovano zbog produžetka konjugacije). Mana ove metode jeste što će jone kompleksirati samo flavonoidi koji u strukturi imaju 5-hidroksi i 4-okso grupe, 3-hidroksi i 4-okso i/ili *orto*-dihidroksi grupe (Slika 3.1.) te metoda nije univerzalna za sve flavonoide (Moncada i sar, 2003).



Slika 3.1. Kompleksiranje Al^{3+} jona flavonoidima, na primeru kvercetina.

Postupak

Pripremljena su razblaženja ekstrakata (po tri koncentracije u opsegu 0,4–8 mg/mL za metanolne i 2,5–10 mg/mL za vodene ekstrakte) u 80%-tnom MeOH. U slučaju radnih proba, po 30 μL ekstrakta je odmereno u mikroploče (96 polja) i dodato 90 μL MeOH, po 6 μL AlCl_3 (0,75 mol/L) i AcONa (1 mol/L) i 168 μL dH_2O . U korekcije je umesto AlCl_3 dodata destilovana voda. Sve radne probe su rađene u tri ponavljanja a korekcije u jednom. Za konstruisanje kalibracione krive napravljena je serija razblaženja kvercetina u opsegu 2,16 - 122,9 $\mu\text{g/mL}$ i analizirana isto kao i ekstrakti. Nakon 30 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, očitana je apsorbancija na 415 nm talasne dužine pomoću Multiskan Spectrum čitača mikroploča (Thermo Corporation).

Izračunavanje

Sa kalibracione krive je očitana koncentracija kvercetina koja odgovara apsorbancijama svake probe nakon oduzimanja apsorbancije korekcije. Dobijene vrednosti koncentracije kvercetina ($\mu\text{g/mL}$) su preračunate na masu suvog ekstrakta (mg/g). Konačni rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta kvercetina po 1g suvog ekstrakta (mg eqQ/g SE) dati kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija.

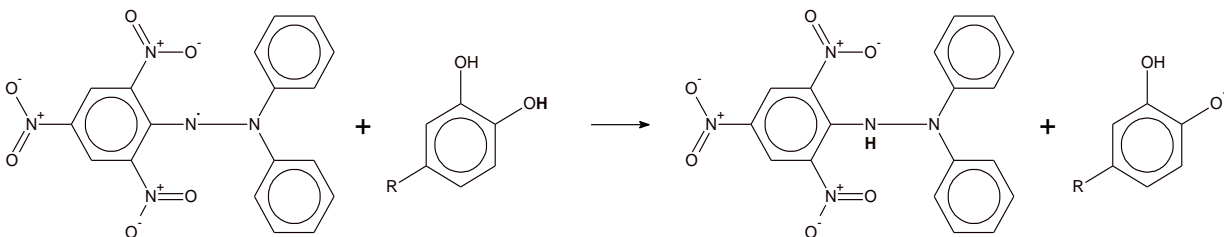
3.5. ISPITIVANJE ANTIOKSIDANTNOG POTENCIJALA EKSTRAKATA

U cilju određivanja antioksidantnog potencijala ispitivanih ekstrakata primenjeno je 6 sledećih testova: neutralizacija azot-centriranog DPPH^\bullet radikala, sposobnost neutralizacije reaktivnih kiseoničnih radikala $^\bullet\text{OH}$ i SOA, neutralizacija azotnog radikala NO^\bullet , sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije i određivanje redukcionog kapaciteta FRAP testom.

3.5.1. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije DPPH^\bullet radikala

Princip

Metoda se zasniva na spektrofotometrijskom praćenju konverzije stabilnog DPPH^\bullet radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), koji je intenzivno ljubičaste boje, u redukovanu, žuto obojenu formu DPPH-H (Sanchez-Moreno i sar, 1998). Fenolna jedinjenja kao prirodni antioksidanti imaju sposobnost da predaju vodonikov atom i na taj način neutrališu ovaj radikal prevodeći ga u redukovanu formu (Slika 3.2.).



Slika 3.2. Reakcija fenola sa DPPH^\bullet radikalom.

Postupak

Pripremljena je serija od sedam razblaženja ekstrakata u opsegu 0,02 - 2 mg/mL za metanolne i 0,08 - 5 mg/mL za vodene ekstrakte u MeOH. Radne probe su pripremljene u mikropločama (96 polja) mešajući 10 μL ekstrakta, 100 μL DPPH reagensa (67,2 nmol/L) i 190 μL MeOH. Metanol je dodan u kontrolu umesto ekstrakta, a u korekcije umesto DPPH reagensa. Sve radne probe i kontrola su rađene u tri ponavljanja a korekcije u jednom. Apsorbancija je očitana nakon 60 minuta inkubacije u mraku na 515 nm talasne dužine pomoću Multiskan Spectrum čitača mikroploča (Thermo Corporation).

Izračunavanje

Za svaku koncentraciju ekstrakta određen je stepen neutralizacije DPPH[•] radikala (I_{DPPH} [%]) prema sledećoj formuli:

$$I_{\text{DPPH}} [\%] = (1 - (A_{\text{rp}} - A_{\text{kor}}) / A_{\text{kon}}) \times 100$$

gde je:

I_{DPPH} - procenat neutralizacije DPPH[•] radikala pri datoj koncentraciji ekstrakta,

A_{rp} - srednja vrednost apsorbancije radne probe za datu koncentraciju,

A_{kor} - apsorbancija korekcije za datu koncentraciju,

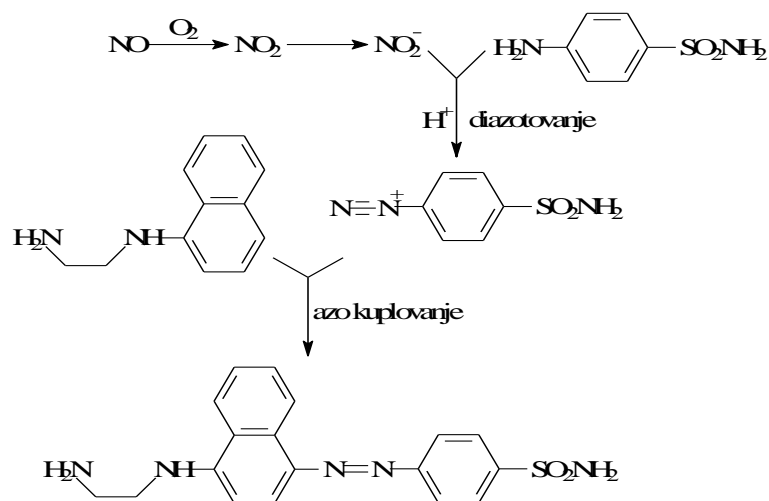
A_{kon} - srednja vrednost apsorbancije kontrole.

Konstruisane su krive zavisnosti stepena neutralizacije DPPH[•] radikala (I_{DPPH} [%]) od radne koncentracije ekstrakta (finalna koncentracija ekstrakta u radnoj probi) pomoću Origin 8.0 softvera (OriginLab, USA), sa kojih je očitana IC_{50} vrednost kao koncentracija (mg/mL) pri kojoj dolazi do neutralizacije 50% DPPH radikala i određena standardna devijacija IC_{50} vrednosti.

3.5.2. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije NO[•] radikala

Princip

Metoda određivanja sposobnosti ekstrakata da neutrališu NO[•] radikal vrši se spektrofotometrijski, pomoću Griess-ovog reagensa. Izvor NO[•] radikala je natrijum-nitroprusid (SNP) koji u vodenim radtvorima pri fiziološkom pH spontano generiše ove radikale. Nastali NO[•] reaguje sa kisonikom iz vazduha dajući nitritne jone. Koncentracija nitrita se određuje po metodi Green-a i saradnika (1982), koja se zasniva na tome da nitriti na sobnoj temperaturi reaguju sa Griess-ovim reagensom (smeša *N*-(1-naftil)-etilendiamin-dihidrohlorida i sulfanilamida u fosfornoj kiselini). Nastaje ružičasti, diazo kompleks (*Slika* 3.3.), čija je količina proporcionalna količini NO[•] radikala i može se odrediti spektrofotometrijski na 546 nm.



Slika 3.3. Mehanizam reakcije nitrita sa Griess-ovim reagensom.

Postupak

Pripremljena je serija od sedam razblaženja ekstrakata u opsegu 3,13–200 mg/mL za metanolne i 0,78–50 mg/mL za vodene ekstrakte u DMSO-u. Pošto je reakcija fotosenzitivna, sve probe su se pripremale u mračnoj komori. Radne probe su pripremljene u mikropločama (96 polja) mešajući 5 μL ekstrakta, 75 μL SNP reagensa (10 mmol/L u fosfatnom puferu) i 75 μL fosfatnog pufera pH = 7,4 (67

mmol/L). U kontrolu je umesto ekstrakta dodat DMSO a u korekcije umesto SNP reagensa, fosfatni pufer. Sve radne probe i kontrola su rađene u tri ponavljanja a korekcije u jednom. Inkubacija je vršena u toku 60 minuta izlaganjem proba konstantnom i intenzivnom izvoru osvetljenja. Nakon toga je u sve probe dodato 150 μ L Griess-ovog reagensa koji je dobijen mešanjem 2 mg/mL N-(1-naftil)-etilendiamin dihidrohlorida (NEDA) u dH₂O sa 20 mg/mL sulfanilamida u 4% fosfornoj kiselini (1:1). Očitana je apsorbancija na talasnoj dužini od 546 nm pomoću Multiskan Spectrum čitača mikroploča (Thermo Corporation).

Izračunavanje

Za svaku koncentraciju ekstrakta određen je stepen neutralizacije NO[•] radikala (I_{NO} [%]) prema sledećoj formuli:

$$I_{NO} [\%] = (1 - (A_{rp} - A_{kor}) / A_{kon}) \times 100$$

gde je:

I_{NO} - procenat neutralizacije NO[•] radikala pri datoj koncentraciji ekstrakta,

A_{rp} - srednja vrednost apsorbancije radne probe za datu koncentraciju,

A_{kor} - apsorbancija korekcije za datu koncentraciju,

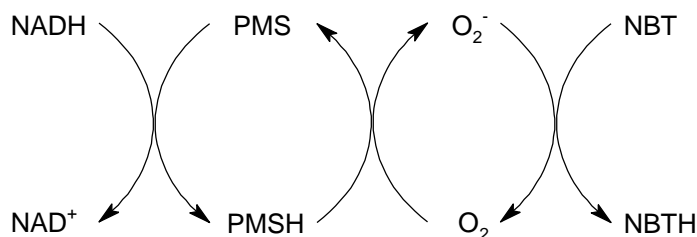
A_{kon} - srednja vrednost apsorbancije kontrole.

Konstruisane su krive zavisnosti stepena neutralizacije NO[•] radikala (I_{NO} [%]) od radne koncentracije ekstrakta (finalna koncentracija ekstrakta u radnoj probi) pomoću Origin 8.0 softvera (OriginLab, USA), sa kojih je očitana IC₅₀ vrednost kao koncentracija (mg/mL) pri kojoj dolazi do neutralizacije 50% NO radikala i određena standardna devijacija IC₅₀ vrednosti.

3.5.3. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije SOA radikala

Princip

Skevindžer aktivnost ispitivanih ekstrakata određena je merenjem njihove sposobnosti da neutrališu superoksid anjon radikale (SOA) nastale tokom aerobne redukcije nitroblu-tetrazolijuma (NBT) pomoću NADH u prisustvu fenazinmetilsulfata (PMS) (Nishikimi i sar, 1972). Stepen redukcije NBT sa NADH u aerobnim uslovima je zanemarljiv (5%) i linearno raste sa količinom dodatog PMS-a. PMS se ponaša kao prenosilac elektrona i znatno utiče na mehanizam redukcije. S obzirom da je strukturno sličan flavinu, PMS u reakciji sa NADH prelazi u redukovani oblik, PMSH. Tokom njegove reoksidacije kiseonikom iz vazduha dolazi do generisanja superoksid anjon radikala (O₂^{•-}) koji u velikoj meri (95%) redukuje NTB (Slika 3.4.). NBT je u oksidovanom obliku bezbojan, a redukcijom prelazi u NBTH koji je plave boje. Dodatkom ekstrakta koji sadrži antioksidante dolazi do neutralizacije O₂^{•-} radikala i smanjenja redukcije NBT reagensa. Količina neutralisanih radikala prati se spektrofotometrijski i proporcionalna je smanjenju intenziteta obojenja.



Slika 3.4. Mehanizam aerobne redukcije NBT-a.

Postupak

Pripremljena je serija od sedam razblaženja ekstrakata u opsegu 0,63–20 mg/mL za metanolne i 0,78–25 mg/mL za vodene ekstrakte u 80%-tnom MeOH. Radne probe su pripremljene u epruvetama mešajući 20 μ L ekstrakta, 200 μ L NBT reagensa (144 mmol/L), po 100 μ L NADH (677 mmol/L) i PMS (60 mmol/L). U kontrolu je umesto ekstrakta dodat 80% MeOH a u korekcije umesto PMS reagensa, destilovana voda. Nakon inkubacije od 6 minuta, u sve probe je dodato po 1,1 mL fosfatnog pufera (pH = 8,3). Sve radne probe i kontrola su rađene u tri ponavljanja a korekcije u jednom. Apsorbancija je očitana 5 minuta nakon dodatka pufera na 560 nm talasne dužine pomoću spektrofotometra Multiskan Spectrum (Thermo Corporation).

Izračunavanje

Za svaku koncentraciju ekstrakta određen je stepen neutralizacije SOA radikala (I_{SOA} [%]) prema sledećoj formuli:

$$I_{SOA} [\%] = (1 - (A_{rp} - A_{kor}) / A_{kon}) \times 100$$

gde je:

I_{SOA} - procenat neutralizacije SOA radikala pri datoj koncentraciji ekstrakta,

A_{rp} - srednja vrednost apsorbancije radne probe za datu koncentraciju,

A_{kor} - apsorbancija korekcije za datu koncentraciju,

A_{kon} - srednja vrednost apsorbancije kontrole.

Konstruisane su krive zavisnosti stepena neutralizacije SOA radikala (I_{SOA} [%]) od radne koncentracije ekstrakta (finalna koncentracija ekstrakta u radnoj probi) pomoću Origin 8.0 softvera (OriginLab, USA) sa kojih je očitana IC_{50} vrednost kao koncentracija (mg/mL) pri kojoj dolazi do neutralizacije 50% SOA radikala i određena standardna devijacija IC_{50} vrednosti.

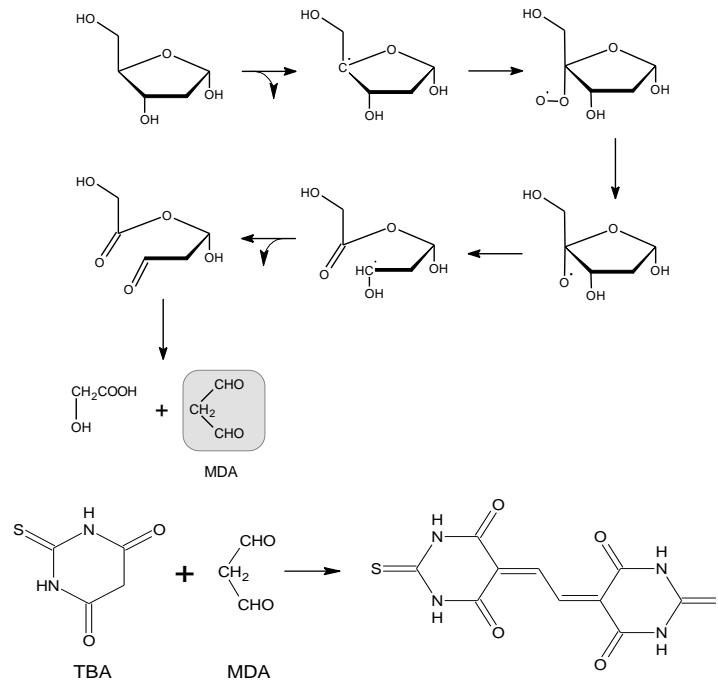
3.5.4. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije \cdot OH radikala

Princip

Sposobnost ekstrakata da neutrališu \cdot OH radikale se određuje praćenjem reakcije degradacije 2-deoksi-D-riboze do koje dolazi u prisustvu OH radikala generisanih u Fentonovoj reakciji (sistem Fe^{2+}/H_2O_2). Jedan od krajnjih produkata degradacije 2-deoksi-D-riboze je MDA (malonildialdehid) koji reaguje sa dva molekula tiobarbiturine kiseline (TBA) i daje ružičasti kompleks koji se određuje spektrofotometrijski na 532 nm (*Slika 3.5.*) (Aruoma, 1994).

Postupak

Pripremljena je serija od sedam razblaženja ekstrakata u opsegu 2,08–200 mg/mL za metanolne i 0,78–50 mg/mL za vodene ekstrakte u DMSO-u. Radne probe su pripremljene u epruvetama mešajući 10 μ L ekstrakta, po 50 μ L 2-deoksi-D-riboze (0,05 mol/L), H_2O_2 (0,015%) i $FeSO_4$ (10 mmol/L) i 1,3 mL fosfatnog pufera (pH = 7,4; 67 mmol/L). U kontrolu je umesto ekstrakta dodat DMSO, a u korekcije umesto 2-deoksi-D-riboze, fosfatni pufer. Sve radne probe i kontrola su rađene u tri ponavljanja a korekcije u jednom. Probe su inkubirane na temperaturi od 37°C u toku 60 minuta. Nakon inkubacije, u sve probe je dodato po 100 μ L EDTA reagensa (0,1 mol/L) i 1 μ L TBA reagensa. TBA reagens se dobija rastvaranjem 10,4 mL $HClO_4$, 3g TBA i 120 g trihlorsirćetne kiseline (TCA) u 800 mL destilovane vode. Po dodatku EDTA i TBA reagensa probe su inkubirane u toku 10 minuta na 100°C nakon čega je očitana apsorbancija na talasnoj dužini od 532 nm pomoću spektrofotometra Multiskan Spectrum (Thermo Corporation).



Slika 3.5. Degradacija 2-deoksi-D-riboze izazvana ·OH radikalom do malonildialdehida (MDA) i njegovo kompleksiranje sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA).

Izračunavanje

Za svaku koncentraciju ekstrakta određen je stepen neutralizacije ·OH radikala (I_{OH} [%]) prema sledećoj formuli:

$$I_{OH} [\%] = (1 - (A_{rp} - A_{kor}) / A_{kon}) \times 100$$

gde je:

I_{OH} - procenat neutralizacije ·OH radikala pri datoj koncentraciji ekstrakta,

A_{rp} - srednja vrednost apsorbancije radne probe za datu koncentraciju,

A_{kor} - apsorbancija korekcije za datu koncentraciju,

A_{kon} - srednja vrednost apsorbancije kontrole.

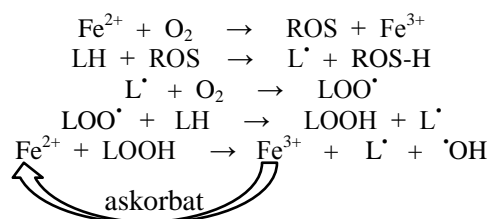
Konstruisane su krive zavisnosti stepena neutralizacije ·OH radikala (I_{OH} [%]) od radne koncentracije ekstrakta (finalna koncentracija ekstrakta u radnoj probi) pomoću Origin 8.0 softvera (OriginLab, USA), sa kojih je očitana IC_{50} vrednost kao koncentracija (mg/mL) pri kojoj dolazi do neutralizacije 50% OH radikala i određena standardna devijacija IC_{50} vrednosti.

3.5.5. Određivanje sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije

Princip

Sposobnost ekstrakata da zaustavi lančanu reakciju lipidne peroksidacije određena merenjem produkata degradacije polinezasićenih masnih kiselina lanenog ulja. Laneno ulje, izolovano iz semena lana ekstrakcijom po Soxhlet-u, je bogato polinezasićenim masnim kiselinama. GC-MS analizom je određeno da sadrži 69,7 % α -linolenske i 13,5 % linolne kiseline, te predstavlja pogodan supstrat za izazivanje lipidne peroksidacije Fe^{2+} /askorbat sistemom. Tačan mehanizam inicijacije lipidne peroksidacije Fe^{2+} jonima nije u potpunosti razjašnjen. Poznato je da Fe^{2+} joni mogu reagovati sa kiseonikom iz vazduha i pri tom generisati reaktivne kiseonične vrste (ROS), koji iniciraju radikalske reakcije lipidne peroksidacije. Askorbinska kiselina održava jone gvožđa u redukovanom stanju ali se dodaje u veoma niskoj koncentraciji da ne bi narušila mehanizam lipidne peroksidacije (Slika 3.6.). Kao jedan od glavnih

degradacionih produkata, nastaje MDA (malonildialdehid) koji se određuje sa TBA reagensom kao što je objašnjeno u postupku prethodnog testa (Slika 3.5.).



Slika 3.6. Slobodno radikalske reakcije lipidne peroksidacije lipida izazvane Fe^{2+} /askorbat sistemom.

Postupak

Pripremljena je serija od sedam razblaženja ekstrakata u opsegu 1,25–120 mg/mL za metanolne ekstrakte u DMSO. Radni rastvor lanenog ulja je dobijen emulgovanjem lanenog ulja (0,035%, v/v) u fosfatnom puferu (pH = 7,4) uz dodatak deterdženta Tween-80 na ultrazvučnom kupatilu u toku 30-40 minuta. Na 1,5 mL radnog rastvora lanenog ulja dodato je po 10 mL ekstrakta, FeSO_4 (4,58 mmol/L) i askorbinske kiseline (80 mmol/L). U kontrolu je umesto ekstrakta dodat DMSO a u korekcije samo ekstrakt i fosfatni pufer (pH = 7,4). Sve radne probe i kontrola su radene u tri ponavljanja a korekcije u jednom. Probe su inkubirane na temperaturi od 37°C u toku 60 minuta. Nakon inkubacije, u sve probe je dodato po 100 mL EDTA reagensa (0,1 mol/L) i 1 mL TBA reagensa. TBA reagens se dobija rastvaranjem 10,4 mL HClO_4 , 3g TBA i 120 g trihlorsirćetne kiseline (TCA) u 800 mL destilovane vode. Po dodatku EDTA i TBA reagensa probe su inkubirane u toku 10 minuta na 100°C, ohlađene i centrifugirane na 1600 g, nakon čega je očitana apsorbancija na 532 nm talasne dužine pomoću spektrofotometra Multiscan Spectrum (Thermo Corporation).

Izračunavanje

Za svaku koncentraciju ekstrakta određen je stepen inhibicije lipidne peroksidacije (I_{LP} [%]) prema sledećoj formuli:

$$I_{LP} [\%] = (1 - (A_{rp} - A_{kor}) / A_{kon}) \times 100$$

gde je:

- I_{LP} - procenat inhibicije lipidne peroksidacije pri datoj koncentraciji ekstrakta,
- A_{rp} - srednja vrednost apsorbancije radne probe za datu koncentraciju,
- A_{kor} - apsorbancija korekcije za datu koncentraciju,
- A_{kon} - srednja vrednost apsorbancije kontrole.

Konstruisane su krive zavisnosti stepena inhibicije lipidne peroksidacije (I_{LP} [%]) od radne koncentracije ekstrakta (finalna koncentracija ekstrakta u radnoj probi) pomoću Origin 8.0 softvera (OriginLab, USA), sa kojih je očitana IC_{50} vrednost kao koncentracija (mg/mL) pri kojoj je lipidna peroksidacija inhibirana na 50% i određena standardna devijacija IC_{50} vrednosti.

3.5.6. Određivanje ukupnog redukcionog kapaciteta (FRAP test)

Princip

Redukcioni kapacitet ekstrakta se određuje nespecifičnom redukcijom Fe^{3+} -TPTZ kompleksa (TPTZ - 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin) do intenzivno plavog Fe^{2+} -TPTZ čiji je apsorpcioni maksimum na 593 nm. Ova metoda originalno je razvijena za određivanje sadržaja redukujućih materija u krvnoj plazmi, otuda i sam naziv FRAP (eng. *ferric reducing ability of plasma*) ali se uspešno primenjuje procenu redukcionog kapaciteta biljnih ekstrakata (Benzie i Strain, 1996).

Postupak

Pripremljena su razblaženja ekstrakata (po tri koncentracije u opsegu 0,25–10 mg/mL za metanolne i 0,5–2 mg/mL za vodene ekstrakte) u 80%-tnom MeOH. Radne probe su pripremljene odmeravanjem po 10 µL ekstrakta u mikroploče (96 polja) i dodato 290 µL FRAP reagensa. FRAP reagens se dobija mešanjem (neposredno pred merenje) acetatnog pufera (pH = 3,6), TPTZ reagensa (10 mmol/L u 40 mmol/L HCl) i FeCl₃ · 6H₂O (20 mmol/L) u odnosu 10:1:1. U korekcije je umesto FRAP reagensa dodata destilovana voda. Sve radne probe su rađene u tri ponavljanja a korekcije u jednom. Za konstruisanje kalibracione krive napravljena je serija razblaženja askorbinske kiseline u opsegu 2,6–204,8 µg/mL i analizirana isto kao i ekstrakti. Nakon 6 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, očitana je apsorbancija na talasnoj dužini od 593 nm pomoću Multiskan Spectrum čitača mikroploča (Thermo Corporation).

Izračunavanje

Sa kalibracione krive je očitana koncentracija askorbinske kiseline koja odgovara apsorbancijama svake probe nakon oduzimanja apsorbancije korekcije. Dobijene vrednosti koncentracije askorbinske k. (µg/mL) su preračunate na masu suvog ekstrakta (mg/g). Konačni rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta askorbinske kiseline po 1 g suvog ekstrakta (mg eqAA/g SE) i dati kao srednja vrednost tri merenja ± standardna devijacija.

3.6. ISPITIVANJE ANTIINFLAMATORNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA

Princip

Određivanje antiinflamatornog potencijala ispitivanih ekstrakata određena je po *ex vivo* metodi Beare i saradnika (2010), kasnije modifikovanoj i validovanoj (Lesjak i sar, 2013). Metoda se zasniva na praćenju uticaja ekstrakata na produkciju metabolita arahidonske kiseline u humanim trombocitima nakon izazivanja inflamacije dodatkom jona Ca²⁺ i kalcijumove jonofore kalcimicina. Trombociti imaju enzime ciklooksigenazu-1 (COX-1) i 12-lipooksigenazu (12-LOX) koji učestvuju u produkciji medijatora inflamacije od kojih su u ovom radu praćeni: 2(S)-hidroksi-(5Z,8E,10E)-heptadekatrienska kiselina (12-HHT), tromboksan B₂ (TXB₂), prostaglandin E₂ (PGE₂), prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) i 2(S)-hidroksi-(5Z,8Z,10E,14Z)-eikozatetraenska kiselina (12-HETE). Količina ovih 5 metabolita određuje se primenom LC-MS/MS tehnike.

Postupak

Određivanje broja trombocita

Humani trombociti korišćeni u ovom eksperimentu su dobijeni sa Instituta za transfuziju u Novom Sadu. Dobijeni trombociti su bili stari 5 dana te se nisu mogli koristiti u medicinske svrhe ali su bili i dalje vijabilni. Rastvor trombocita je neophodno konstantno mućkati na temperaturi 20-24°C da ne bi došlo da njihove agregacije. Brojanje trombocita se vrši u Neubauer-ovoj komori nakon tretiranja trombocita 1% amonijum-oksalamatom, pri čemu se pod mikroskopom vijabilni trombociti uočavaju kao svetlucave čestice. Rastvor za brojanje se pravi mešanjem 10 mL koncentrata trombocita u 990 mL 1% amonijum-oksalata (10 mg/mL). Nakon 10 minuta, 10 mL ovog rastvora se nanosi na Neubauer-ovu komoru i broje se ćelije trombocita u barem 4 kvadratna polja (uzima se srednja vrednost) na uvećanju od 40x. Konačan broj trombocita (trombociti / mL) se dobija množenjem srednje vrednosti izbrojanih ćelija na 4 polja sa faktorom razblaženja (100) i deljenjem dobijenog broja sa 4 x 10⁻⁶ (zapremina jednog kvadratnog polja).

Postavka eksperimenta

Za eksperiment se koristi suspenzija trombocita u puferu pH = 7,2 (0,137 mol/L NaCl; 2,7 mmol/L KCl; 2 mmol/L KH₂PO₄; 5 mmol/L Na₂HPO₄ i 5 mmol/L glukoze) u takvom odnosu da broj trombocita bude 2 x 10⁸ trombocita/mL. Odmereno je po 2 mL ove suspenzije i mućkano u toku 5 minuta na 37°C,

nakon čega je dodato po 100 μL ekstrakta odgovarajuće koncentracije (opseg razblaženja 1–200 mg/mL za metanolne ekstrakte) i rastvora kalcimicina (125 mmol/L). Dobijene probe su promućkane na 37°C u toku 2 minuta a zatim je dodato 300 μL CaCl_2 (16,7 mmol/L) i vršena je ponovna inkubacija na 37°C, uz blago mućkanje. Umesto ekstrakta u kontrolu i slepu probu sipan je DMSO, a u korekciju i slepu probu umesto kalcimicina DMSO, i dH_2O umesto CaCl_2 . Reakcija je stopirana dodatkom 5,8 mL hladne 1% mravlje kiseline. Kao interni standard korišćen je PGB_2 (50 μL ; 6 mg/mL) koji je i sam metabolit arahidonske kiseline. Nastali metaboliti su ekstrahovani pomoću 8 mL smeše $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1) uz intenzivno mućkanje (Vortex) u toku 15 minuta. Nakon toga, smeše su centrifugirane (15 min, 10000 o/min, 4°C), organski sloj je odvojen, uparen pod smanjenim pritiskom i rekonstituisan u 500 mL MeOH. Svaki uzorak je profiltriran kroz membranske filtere (45 mm, Econofilters, Agilent Technologies) i analiziran na LC-MS.

Zbog niske koncentracije osnovnih vodenih ekstrakata postupak je bio modifikovan da bi se dostigle više radne koncentracije ekstrakta. Naime, dodavano je po 100 μL ekstrakta (koncentracije u opsegu 2–50 mg/mL) i upola manja zapremina svih ostalih reagensa te su se radne koncentracije kretale u opsegu 0,08–7,14 mg/mL.

LC-MS/MS analiza

Za kvantifikaciju odabranih metabolita arahidonske kiseline korišćen je Agilent Technologies 1200 Series Rapid Resolution tečni hromatograf kuplovan sa G6410A QqQ MS-MS detektorom sa elektrosprej (ESI) jonskim izvorom. Softver MassHunter Workstation Data Acquisition ver. B.01.03 (Agilent Technologies) je korišćen za obradu podataka. Hromatografsko razdvajanje je vršeno na Zorbax SB-C18 30 mm \times 2.1 mm \times 3.5 μm (Agilent Technologies) reversno-faznoj koloni pri temperaturi od 65°C. Binarna mobilna faza sastojala se od 0.6% sirćetne kiseline (A) i metanola (B), a protok je iznosio 1.0 mL/min. Primenjen je gradijentni mod, koji je podrazumevao sledeći odnos faza: 0.0 min 65% B, 2.0 min 100% B, 3.5 min 100% B, sa post-vremenom od 3.0 min. Injektovana zapremina svih uzoraka je bila 5 μL . ESI parametri bili su: gas za sušenje (N_2) temperature 350°C, protok 9 L/min, pritisak gasa nebulajzera 40 psi, napon na kapilari 4 kV i napon fragmentora 120 V. Kvantifikacija jedinjenja urađena je u SRM modu uz negativni polaritet. Praćeni su sledeći metaboliti:

- PGB_2 (jon prekursor $m/z = 333$, koliziona energija 13 V, jon produkt $m/z = 315$);
- 12-HHT (jon prekursor $m/z = 279$, koliziona energija 5 V, jon produkt $m/z = 261$);
- TXB_2 (jon prekursor $m/z = 369$, koliziona energija 15 V, jon produkt $m/z = 169$);
- PGE_2 (jon prekursor $m/z = 351$, koliziona energija 15 V, jon produkt $m/z = 271$);
- $\text{PGF}_{2\alpha}$ (jon prekursor $m/z = 353$, koliziona energija 5 V, jon produkt $m/z = 309$);
- 12-HETE (jon prekursor $m/z = 319$, koliziona energija 7 V, jon produkt $m/z = 301$).

Izračunavanje

Za svaku koncentraciju ekstrakta (i svaki metabolit) utvrđen je stepen inhibicije prema sledećoj jednačini:

$$I [\%] = (1 - (R_{rp} - R_{kor}) / (R_{kon} - R_{sp})) \times 100$$

gde je:

I - stepen inhibicije produkcije određenog metabolita pri datoj koncentraciji ekstrakta,

R_{rp} - odnos odgovora (eng. *responce ratio*) radne probe za datu koncentraciju,

R_{kor} - odnos odgovora korekcije za datu koncentraciju,

R_{kon} - odnos odgovora za kontrolu,

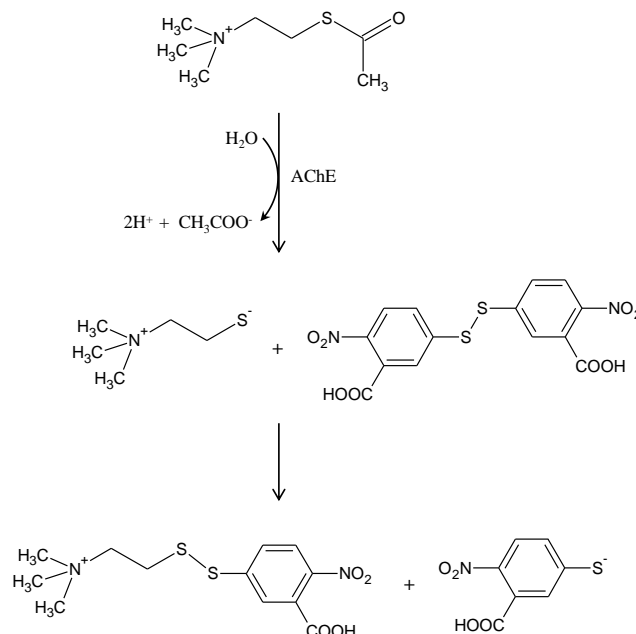
R_{sp} - odnos odgovora za slepu probu,

Odnosi odgovora određeni su kao odnos površine pika datog analita i površine pika internog standarda (PGB₂) u istoj probi. Konstruisane su krive zavisnosti vrednosti inhibicije [%] od radne koncentracije ekstrakta (koncentracija ekstrakta u finalnoj reakcionoj smeši pre dodatka 1 % HCOOH) pomoću Origin 8.0 softvera (OriginLab, USA), i očitana je IC₅₀ vrednost kao koncentracija koja smanjuje sintezu odgovarajućeg metabolita (12-HHT, TXB₂, PGE₂ ili 12-HETE) na 50% u odnosu na kontrolu. Rezultat je izražen kao IC₅₀ vrednost ± standardna devijacija ponovljivosti (određena tokom validacije metode).

3.7. ODREĐIVANJE SPOSOBNOSTI INHIBICIJE ACETILHOLINESTERAZE

Princip

Određivanje uticaja ispitivanih ekstrakata na aktivnost enzima acetilholinesteraze (AChE) se vrši spektrofotometrijski po modifikovanoj metodi koju su razvili Ellman i saradnici (1961) prilagođenoj za mikroploče od 96 polja. Kao supstrat se koristi acetiltioholin koji se dejstvom AChE razlaže na acetat i tioholin. Oslobođeni tioholin reaguje sa 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoevom kiselinom (DTNB) pri čemu se oslobađa žuti anjon 5-tio-2-nitrobenzoat čija se količina određuje spektrofotometrijski na 412 nm i proporcionalna je aktivnosti acetilholinesteraze (Slika 3.7.).



Slika 3.7. Mehanizam razgradnje acetiltioholina pomoću AChE i reakcija tioholina sa DTNB-om.

Postupak

U eksperimentu je korišćen enzim acetilholinesteraza (EC Number: 3.1.1.7.) izolovan iz električne jegulje (Sigma, C3389) koji je rastvoren u 1 mL BSA rastvora (1 mg/mL u 20 mmol/L Tris-HCl puferu, pH = 7,5). Ovako dobijen osnovni rastvor enzima (500 U/mL) je alikvotiran u manje porcije i čuvan na -20°C. Radni rastvor enzima se dobija razblaživanjem osnovnog rastvora sa Tris-HCl puferom (20 mmol/L; pH = 7,5) do koncentracije od 2,4 U/mL i u toku rada je uvek držan na ledu. Uticaj ekstrakata na aktivnost enzima AChE je određivan pri radnoj koncentraciji svih ekstrakata od 1 mg/mL. Za sve probe obavezno je koristiti isti radni rastvor enzima, da bi rezultati bili uporedivi. U mikroploče je preneto po 10 µL radnog rastvora enzima, 20 µL rastvora DTNB (4,7 mmol/L u 0,1 mol/L fosfatnom puferu, pH = 7,0), 15 µL ekstrakta i 245 µL fosfatnog pufera (0,1 mol/L, pH = 8,0). U korekcije je umesto enzima dodat Tris-HCl pufer a u kontrole umesto ekstrakta 80%-ni MeOH. Radne probe i kontrola su rađene u tri ponavljanja a

korekcije u jednom. Kao poznati inhibitor acetilholinesteraze korišćen je galantamin, takođe pri radnoj koncentraciji od 1 mg/mL. Sve probe su inkubirane na 25°C u toku 15 minuta nakon čega je, u što kraćem vremenskom periodu u sve probe dodato po 10 µL acetiltioholina (14 mmol/L). S obzirom da je reakcija koju katalizuje AChE izuzetno brza, potrebno je izmeriti apsorbanciju na 412 nm, odmah po dodatku supstrata i nakon 1 minuta.

Izračunavanje

Procenat inhibicije enzima acetilholinesteraze je računat prema sledećoj jednačini:

$$I_{\text{AChE}} [\%] = (1 - \Delta A_{\text{rp}} / \Delta A_{\text{kon}}) \times 100$$

gde je:

I_{AChE} - procenat inhibicije enzima pri koncentraciji ekstrakta od 1 mg/mL,

ΔA_{rp} - promena apsorbancije radne probe u jednom minutu umanjena za apsorbanciju odgovarajuće korekcije ($\Delta A_{\text{rp}} = (A_{\text{rp}(1\text{min})} - A_{\text{kor}(1\text{min})}) - (A_{\text{rp}(0\text{min})} - A_{\text{kor}(0\text{min})})$)

ΔA_{kon} - promena apsorbancije kontrole u jednom minutu umanjena za apsorbanciju slepe probe ($\Delta A_{\text{kon}} = (A_{\text{kon}(1\text{min})} - A_{\text{sp}(1\text{min})}) - (A_{\text{kon}(0\text{min})} - A_{\text{sp}(0\text{min})})$).

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost tri inhibicije \pm standardna devijacija ponovljivosti.

3.8. ISPITIVANJE UTICAJA EKSTRAKATA NA IMUNI ODGOVOR I PROLIFERACIJU ĆELIJSKIH LINIJA IEC18 I Caco2

3.8.1. Uslovi gajenja ćelijskih kultura

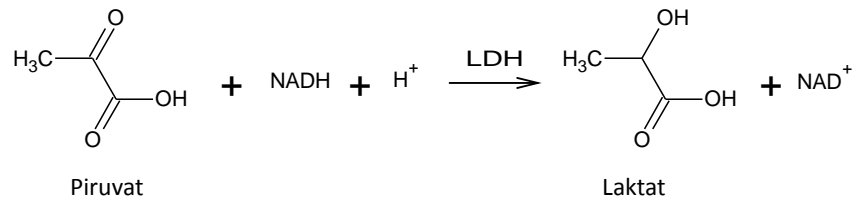
U radu su korišćene dve adherentne ćelijske linije: intestinalne epitelne ćelije pacova - IEC18 (ECACC 88011801) i intestinalne humane intestinalne ćelije kolonorektalnog adenokarcinoma - Caco2 (ECACC 86010202). Obe ćelijske linije su bile obezbeđene od strane Službe za ćelijske linije Univerziteta u Granadi (Servicio de Cultivo Celular, Universidad de Granada). Ćelije su kultivisane u DMEM medijumu sa dodatkom 10 %-nog FBS-a, L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL), streptomicina (0,1 mg/mL) i amfotericina B (2,5 mg/mL) u flaskovima od 78 cm² (Soria genlab, Madrid, Spain), na temperaturi od 37°C u atmosferi 5%-nog CO₂ do postizanja monosloja. Medijum je menjan svaka 2-3 dana. Prilikom presađivanja ćelija, za odvajanje ćelija od podloge i raskidanje međućelijskih veza korišćen je 1 mL rastvora tripsina/EDTA (25 mg/mL tripsina / 2 mg/mL EDTA). Stimulisanje inflamatornog odgovora ćelijske linije IEC18 postignuto je dodatkom LPS-a (1 mg/mL), odnosno dodatkom IL-1 β (10 ng/mL) kod Caco2 ćelija. Za eksperimente su korišćene ćelije koje su formirale monosloj, nakon čega su inkubirane sa ekstraktima (koncentracije zavisne od eksperimenta) u toku 24h.

3.8.2. Određivanje citotoksičnosti ekstrakata merenjem aktivnosti enzima LDH

Uticaj ispitivanih ekstrakata na vijabilnost ćelija određen je merenjem aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH) ćelijskom medijumu. Ukoliko su ćelije oštećene komponentama ekstrakta, dolazi do povećanog oslobađanja LDH u ekstracelularni prostor. Merenjem aktivnosti ovog enzima u medijumu u kojem su ćelije gajene može odrediti stepen oštećenja ćelija izazvan inkubacijom sa ekstraktima.

Princip

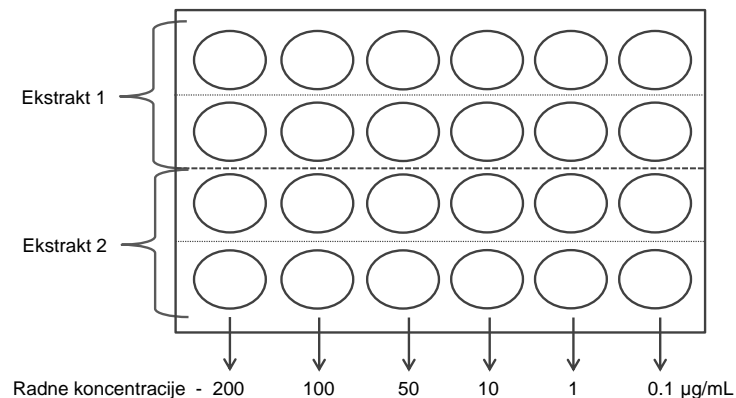
Laktat dehidrogenaza katalizuje redukciju piruvata sa NADH u reakciji:



Brzina smanjenja koncentracije NADH, koja se prati spektrofotometrijski na 340 nm, proporcionalna je aktivnosti LDH u uzorku.

Postupak

Ćelije su zasejane u mikroploče sa 24 polja, nakon što su dostigle monosloj, medijum je zamenjen, i dodati su ekstrakti u šest radnih koncentracija (opseg: 0,1–200 mg/mL) u dva ponavljanja (*Slika 3.8.*). Postavljene su i kontrole, jedna samo sa medijumom a druga da dodatkom DMSO-a u koncentraciji prisutnoj u samim razblaženjima ekstrakata, obe kontrole su rađene u duplikatu. Nakon 24 sata inkubacije, medijum iznad ćelija je pokupljen, centrifugiran (10000 rpm / 5 min) da bi se odvojili ostaci ćelija i iz supernatanta je određena aktivnost LDH. Test je urađen prateći instrukcije proizvođača (LDH-LQ, Spinreact, Spain). U mikroploče sa 96 polja, odmereno je 5 µL svakog uzorka i nakon toga je dodato 195 µL radnog reagensa (4 dela R1 (imidazol - 65 mmol/L + piruvat - 0,6 mmol/L) + 1 deo R2 (NADH - 0,18 mmol/L)). Nakon toga, očitana je inicijalna apsorbansa na 340 nm, i ponovo nakon 1 minuta.



Slika 3.8. Šema mikroploče u testu određivanja citotoksičnosti ekstrakata merenjem aktivnosti enzima LDH.

Izračunavanje

Rezultat se računa prema sledećoj formuli:

$$\Delta A/\text{min} \times 4925 = \text{aktivnost LDH u U/L.}$$

Rezultati su izraženi kao U/L gde U predstavlja internacionalnu jedinicu koja označava količinu enzima koja transformiše 1 mmol supstrata po minuti, pri standardnim uslovima.

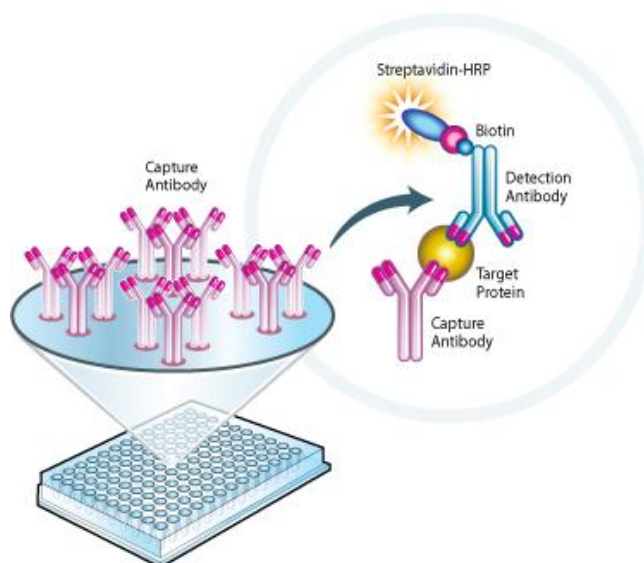
3.8.3. Merenje sekrecije citokina

Određivana je sekrecija sledećih citokina ELISA metodom (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*): iz IEC18 ćelija citokini rat MCP1 i GRO α , a iz Caco2 ćelija citokini humani MCP1 i IL-8.

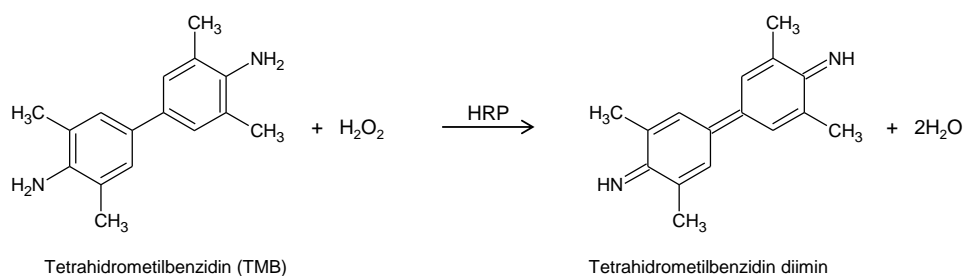
Princip

Nivo sekrecije citokina je određivan enzimskom sendvič-immunosorbpcionom metodom (*Slika 3.9.*). Mikroploče se najpre blokiraju monoklinalnim antitelom za "hvatanje" (eng. *capture antibody*) ciljnog proteina (eng. *target protein*) u toku noći. Nanošenjem uzorka koji sadrži ciljni protein, on se vezuje za antitelo i ostaje fiksiran na mikroploči. Sledeći korak je dodavanje antitela za detekciju (eng. *detection antibody*) koji na svom drugom kraju ima vezan biotin, protein koji ima visok afinitet za protein streptavidin. Za streptavidin je vezan enzim HR peroksidaza (eng. *HRP - horseradish peroxidase*).

Kada je ostvarena veza: **antitelo za hvatanje + ciljni protein + antitelo za detekciju (biotin) + streptavidin-HRP**, dodaje se supstrat za peroksidazu H_2O_2 , uz prisustvo tetrametilbenzidina (TMB). Nakon reakcije, TMB prelazi u diimin (*Slika 3.10.*), menja boju i dodatkom kiseline kao stop reagensa može se odrediti količina proizvoda menjanjem apsorbance na 450 nm.



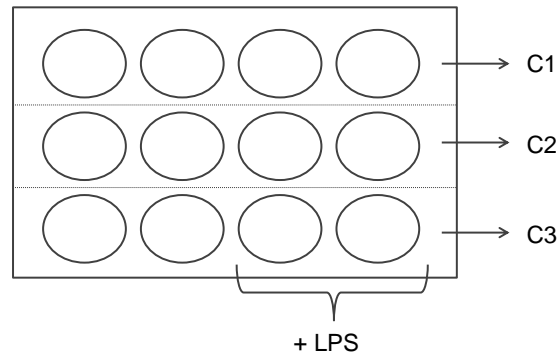
Slika 3.9. Princip ELISA (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*) testa.



Slika 3.10. Konverzija tetrahidrometilbenzidina pomoću peroksidaze do diimina koji apsorbuje na 450 nm.

Postupak

Za svaki ekstrakt zasejane su ćelije u mikroploči od 12 polja. Kada su ćelije dostigle monosloj, u medijum su dodati ekstrakti u tri koncentracije (0,5–100 mg/mL). Svaka koncentracija je rađena sa i bez dodatka LPS-a u duplikatu. LPS je dodat 2h nakon dodatka ekstrakata. Šema mikroploče je data na *Slici 3.11.*



Slika 3.11. Šema mikroploče u testu određivanja uticaja ekstrakata na sekreciju citokina.

Nakon 24h, medijum je pokupljen, centrifugiran (10000 rpm / 5 min) da bi se uklonili ostaci ćelija, supernatant je prebačen u druge ependorfe (talog odbačen), i zamrznuti na -80°C do analize. Određivanje koncentracije citokina u uzorcima je rađeno prateći instrukcije proizvođača kitova: BD Biosciences, San Diego, USA - rat MCP1 (Cat.No. 555130), humani MCP1 (Cat.No. 555179) i IL-8 (Cat.No. 555244) i GRO α - RnD Systems, Minneapolis, USA; Cat.No. DY515. Nakon stopiranja reakcije, očitane su apsorbance na 450 nm koristeći spektrofotometar (BIO RAD, 680 XR). Za svaki određivani protein, konstruisana je kalibraciona kriva korišćenjem serije duplih razblaženja standarda određivanog proteina. Rezultati očitavanja apsorbanci su obrađeni u softveru Microplate manager, ver 5.2.1. BIO RAD tako što su se sa kalibracione krive očitale koncentracije proteina koje odgovaraju apsorbancama uzoraka i dobijeni rezultati su izraženi u pg/mL kao srednja vrednost dva merenja \pm SEM (eng. *standard error of the mean*).

3.8.4. Određivanje uticaja na signalne puteve u sekreciji citokina rat MCP1 i GRO α

Radi identifikacije signalnog puta preko kojeg odabrani ekstrakti vrše stimulaciju produkcije citokina, odabrano je 5 inhibitora selektivnih za različite kinaze i posmatrana produkcija citokina u takvim uslovima.

Princip

Brojni signalni putevi učestvuju u stimulaciji gena za ekspresiju citokina. Da bi se odredio signalni put koji stimulišu određeni ispitivani ekstrakti primenjuju se inhibitori određenih signalnih molekula (najčešće protein kinaza) i posmatra se produkcija citokina u takvim uslovima. Ukoliko uz inhibitor određenog signalnog puta opadne sekrecija citokina, znači da ekstrakt stimuliše upravo taj signalni put i preko njega povećava sekreciju citokina.

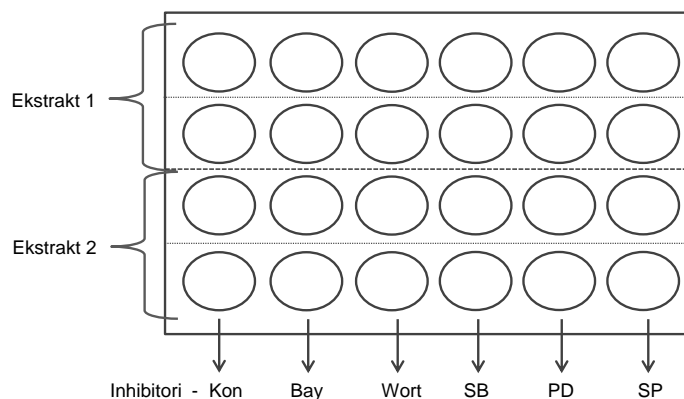
Tabela 3.5. Primenjeni inhibitori, njihovi ciljni proteini kao i signalni put u kojem učestvuju.

Inhibitor	Kinaza koju inhibira	Inhibirani signalni put	Radna koncentracija
Bay 11-7082	Inhibirani signalni put	NF- κ B signalni put	10 μM
Wortmannin	I κ B-a fosforilaza	Akt signalni put	1 μM
SB203580	NF- κ B signalni put	MAPK signalni put	10 μM
PD98059	Fosfatidilinozitol-3-kinaza	MAPK signalni put	10 μM
SP600125	Akt signalni put	MAPK signalni put	10 μM

Postupak

Ćelije su zasejane u mikroploče sa 24 polja (Slika 3.12.), nakon što su dostigle monosloj, medijum je zamenjen i dodato je 5 inhibitora (Tabela 3.5.). Nakon 1h inkubacije samo sa inhibitorima, dodati su ekstrakti u radnim koncentracijama od 50 mg/mL (ekstrakti korenja) i 100 mg/mL (ekstrakti herbi). Nakon 24h, iz medijuma je određen nivo citokina po postupku opisanom u prethodnom poglavlju. Kontrola za

svaki ekstrakt je predstavljala probu gde su ćelije inkubirane samo sa ekstraktom (šema mikroploče - *Slika 3.12.*). Sve probe su rađene u duplikatu i dobijeni rezultati su izraženi u pg/mL kao srednja vrednost dva merenja \pm SEM.



Slika 3.11. Šema mikroploče u testu određivanja uticaja ekstrakata na sekreciju citokina.

3.8.5. Blokiranje ekspresije gena za TLR4 i MyD88 lentiviralnim česticama

Najčešći put aktivacije nespecifičnog imunog odgovora intestinalnih epitelnih ćelija jeste put aktivacije TLR4 receptora i njegovog adapternog proteina MyD88 (poglavlje 2.3.3.2.). Da bi se utvrdilo da li odabrani ekstrakti povećavaju imuni odgovor ovih ćelija preko ovog receptora korišćene su IEC18 ćelije koje imaju blokirane gene upravo za ova dva proteina (knock-down za TLR4 i MyD88).

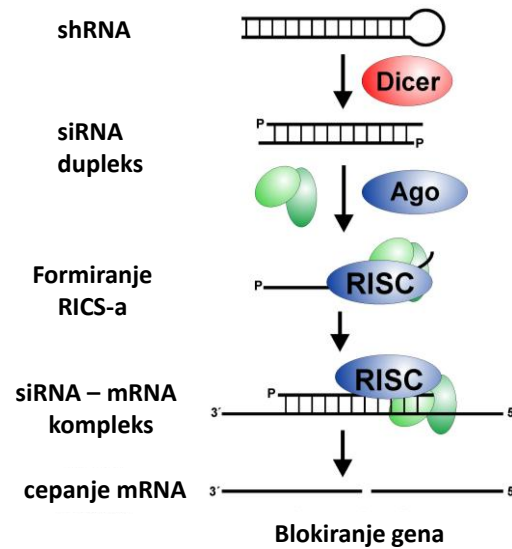
Princip

Aktivacija TLR4 - MyD88 sistema rezultuje povećanom produkcijom citokina. U cilju provere da li odabrani ekstrakti stimulišu ovaj sistem koriste se ćelije koje imaju utihnute gene (eng. *silenced genes*) za ova dva proteina od strane lentiviralnih čestica. Inkubacijom sa odabranim lentiviralnim česticama, ubacuje se vektor u genom ćelija domaćina i to u region genoma u kome se aktivno vrši transkripcija. Dejstvom polimeraze II ili III vrši se transkripcija shRNA koja je (*Slika 3.12.*), po izlasku iz jedra, obrađena dejstvom enzima Dicer, daje siRNA dupleks (eng. *small interfering RNA*) i spaja se sa RISC kompleksom (eng. *RISC - RNA-induced silencing complex*). Antisens sekvenca na siRNA vodi RISC do komplementarne mRNA. Ukoliko dođe do savršenog uklapanja siRNA-mRNA, RICS cepa mRNA i na taj način je onemogućena sinteza određenog proteina. U tim uslovima se posmatra dejstvo ekstrakta na produkciju citokina. Ukoliko je smanjena produkcija citokina kada je onemogućena sinteza određenog proteina znači da ekstrakti u normalnim uslovima stimulišu produkciju citokina upravo preko signalne molekule.

Postupak

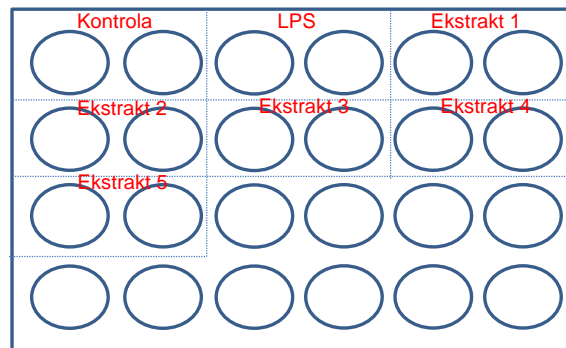
Blokiranje ekspresije gena - ćelije su zasejane u mikroploče od 12 polja i praćena su uputstva data u protokolu proizvođača (Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Germany). Nakon 24h, kada su ćelije formirale 50%-ni monosloj, dodat je polibren (Polybrene, sc-134220) u radnoj koncentraciji od 5 mg/mL. Polibren je polikatjon koji neutrališe odbijajuće sile između kapsida virusa i membrana ćelija, i olakšava spajanje i ulazak virusa u ćeliju. U nastavku eksperimenta, ćelije su inficirane lentiviralnim česticama odvojeno: shRNA kontrola (sc-108080), shRNA MyD88 (sc-106986-V) i shRNA TLR4 (sc-156001-V). Efikasnost transfekcije je proverena primenom lentiviralnih čestica copGFP (sc-108084). 24h nakon transfekcije, ćelije su isprane medijumom (bez polibrena) i inkubirane još 24h. Radi odabira stabilnih klonova koji vrše ekspresiju shRNA, ćelije su bile rasejane u odnosu 1:3 - 1:5 i dodatno inkubirane (24-48h). Dodatan odabir stabilnih klonova sa ekspresijom shRNA vršen je dodatkom antibiotika puromicina dihidrohlorida (sc-108071) u opsegu koncentracija 2–10 μ g/mL u medijumu. Ćelije sa shRNA su rezistentne na puromicin jer je sa lentiviralnim česticama, pored gena za shRNA, ubačen i gen koji ih čini

rezistentnim na ovaj antibiotik, tako da u uslovima gajenja ćelija u medijumu sa puromicinom, preživljavaju samo ćelije sa uspešnom transfekcijom. Kao konačna potvrda ekspresije shRNA primenjene su metode RT-PCR i Western blot-a.



Slika 3.12. Proces blokiranja gena nakon ubacivanja lentiviralnih čestica - eng. *silencing genes*.

Proba sa ekstraktima - u mikroploče od 24 polja zasejane su ćelije za shRNA kontrola, shRNA za TLR4 i shRNA za MyD88. Šema mikroploče je data na *Slici 3.13*. Kada je dostignut monosloj, ekstrakti su dodati u radnim koncentracijama od 50 µg/mL (ekstrakti korenja) i 100 µg/mL (ekstrakti herbi). Nakon 24h, iz medijuma je određen nivo citokina po prethodno opisanom postupku.



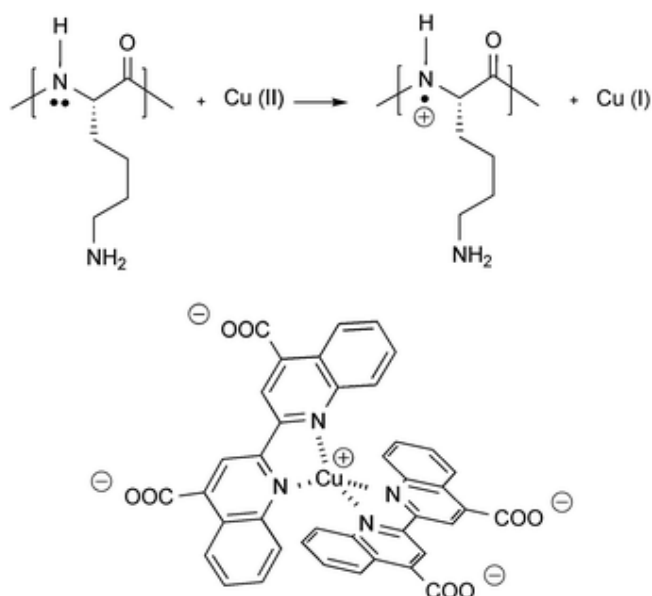
Slika 3.13. Šema mikroploče u testu sa ćelijama koje imaju utihnute gene za TLR4 i MyD88 proteine.

3.8.6. Izolacija i kvantifikacija proteina iz ćelija

Izolacija i kvantifikacija proteina služi kao priprema uzoraka za određivanje ekspresije jednog konkretnog proteina metodom Western blot-a.

Princip

Izolacija proteina se vrši uz obavezno prisustvo inhibitora proteaza, uz mehaničku lizu ćelija. Koncentracija izolovanih proteina u rastvoru se određuje metodom sa bicinoninskom kiselinom (eng. *BCA - bicinchoninic acid*), slično metodi po Lowry-u. Prvo se formira kompleks proteina sa jonima Cu^{2+} u baznim uslovima (*Slika 3.14.*), što je praćeno redukcijom Cu^{2+} u Cu^{+} . Obim redukcije je proporcionalan količini proteina. Nastali Cu^{+} formira ljubičasti kompleks sa BCA u baznoj sredini te se merenjem apsorbance na 562 nm može izmeriti količina nastalog Cu^{+} koja je proporcionalna količini proteina u uzorku.



Slika 3.14. Princip kvantifikacije proteina BCA metodom (eng. *BCA - bicinchoninic acid*).

Postupak

Izolacija proteina se vrši mehaničkim odvajanjem ćelija od podloge i mešanjem sa puferom za homogenizaciju RIPA (koji sadrži 1xPBS (eng. *phosphate buffered saline*), 0,1% SDS (eng. *sodium dodecyl sulfate*), 0,1% Na-dezoksiholat i 15 Triton X-100) u koji je dodata komercijalna smeša inhibitora proteaza (sigma P8340) koji sadrži sledeće inhibitore: AEBSF, aprotinin, bestatin, E64, leupeptin i pepstatin A. Nakon homogenizacije, vrši se sonifikacija (20 pulseva, Ultrasonic Procesor UP2005) u cilju razbijanja ćelijskih membrana i oslobađanja ćelijskih proteina, centrifugiranje (10000 rpm / 5 min) radi uklanjanja ostataka ćelijskih membrana i odvajanja supernatanta u kome se nalaze proteini.

Kvantifikacija proteina se vrši tako što se po 4 μ L uzorka (supernatanta) prenese u mikroploču od 96 polja i doda 200 μ L radnog reagensa. Radni reagens se dobija mešanjem dva rastvora: rastvora 1 (10 mg/mL BCA, 20 mg/mL Na₂CO₃ x H₂O, 1,6 mg/mL Na-tartarata, 4 mg/mL NaOH, 9,5 mg/mL NaHCO₃ pri pH=11,25) i rastvora 2 (40 mg/mL CuSO₄ x 5H₂O) u odnosu 50:1. Postavlja se kalibraciona kriva serijom duplih razblaženja albumina goveđeg seruma (eng. *BSA - bovine serum albumin*) i tretira isto kao i uzorci. Sve probe se rade u duplikatu. Inkubacija se vrši u toku 1h na 37°C i nakon čega se očita apsorbcija na 562 nm. Rezultati očitavanja apsorbcija su obrađeni u softveru Microplate manager, ver 5.2.1. BIO RAD tako što su sa kalibracione krive očitane koncentracije proteina koje odgovaraju apsorbcijama uzoraka i dobijeni rezultati su izraženi u μ g/ml.

3.8.7. Western blot

Metoda Western blota je primenjena da bi se utvrdio uticaj ekstrakata na ekspresiju proteina: PCNA, COX-2, vilina i aktina.

Princip

Razdvajanje proteina se vrši diskontinualnom SDS PAG elektroforezom na osnovu veličine proteina i njihovog naelektrisanja. Nakon razdvajanja proteina tj. završene elektroforeze, proteini se prebacuju (transferuju) na nitrocelulozne membrane, radi lakše dalje manipulacije uzorcima. Identifikacija i kvantifikacija ciljnog proteina na membranama se postiže inkubacijom prvo sa antitelom za dati protein, a zatim se za to, primarno antitelo, vezuje sekundarno koje je konjugovano sa enzimom peroksidazom. Vizuelizacija proteina na membrani se vrši dodatkom supstrata peroksidaze i meri se hemiluminiscencija

fotografisanjem na filmu u mračnoj komori. Kvantifikacija dobijenih rezultata (površine mrlja koje su proporcionalne količini ciljnog proteina u uzorcima) urađena je koristeći program Image J.

Postupak

Uzorci koji sadrže ćelijske proteine, dobijene po postupku opisanom u prethodnom poglavlju, zagrevani su u toku 5 minuta na 95°C (AccuBlock, Labnet) sa Laemli puferom (Bio Rad, Madrid, Spain). Razdvajanje proteina je vršeno na akrilamidnim gelovima a za praćenje toka elektroforeze, na svaki gel je nanesen standardni rastvor obojenih proteina (Bio Rad 161-0318). Nakon razdvajanja, proteini su preneti na nutrocelulozne (PCNA, vilin, aktin) i PVDF (COX-2) membrane pomoću Trans-Blot Turbo (Bio Rad) aparata u puferu za elektroforezu (Bio Rad, 161-0772). Da bi se proverile pozicije proteina na membranama, urađena je proba sa Ponceau crvenim (0,5% Ponceau crveno u 15-noj sirćetnoj kiselini). Membrane su isprane od boje (3x5 min sa TBS-T-om) i blokirane u toku 90 minuta na sobnoj temperaturi uz mućkanje sa puferom za blokiranje tj. 5%-nim rastvorom mleka u prahu u TBS-T (eng. *Tris-buffered saline* + 0,1% Tween-20). Inkubacija sa primarnim antitelom (razblaženim u 5%-nom albuminu u TBS-T-u) je bila u toku noći na 4°C uz mućkanje a sa odgovarajućim sekundarnim antitelom (razblaženim u puferu za blokiranje) u toku 90 min (*Tabela 3.6.*). Hemiluminiscencija je izazivana ECL reagensom (Plus-ECL NEL103001EA, Western Lightning) i detektovana na filmu (Amersham Hyperfilm™ ECL, 18x24 cm, 28906837) u mračnoj komori koristeći razvijач (B/W negative developer, TETENAL, 100154) i fiksator (Superfix plus, TETENAL, 1027652). Kvantifikacija dobijenih rezultata (površine mrlja na filmu koje su proporcionalne količini ciljnog proteina u uzorcima) urađena je koristeći program Image J. Rezultati za PCNA, vilin i COX-2 su normalizovani na količinu odgovarajućih kontrola za svaki gel i nakon toga na količinu aktina u odgovarajućim uzorcima.

Tabela 3.6. Antitela koreišćena u radu (imena, proizvođač i razblaženje).

Kvantifikovan protein	Primarno antitelo	Sekundarno antitelo
PCNA	anti-PCNA (1:1000) BD Biosciencias, 610665	anti-mouse (1:5000) Sigma A4416
Vilin	anti-villin (1:500) Santa Cruz (sc-28283)	anti-rabbit (1:10000) Sigma A9169
COX-2	anti-COX-2 (1:1000) Cayman Technologies 160106	anti-rabbit (1:10000) Sigma A9169
Aktin	anti-aktina (1:500) Sigma A2066	anti-mouse (1:5000) Sigma A4416

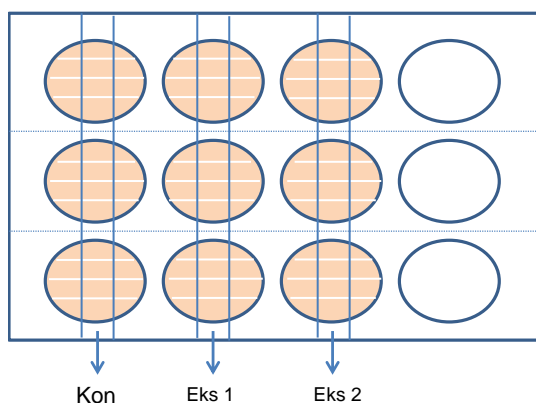
3.8.9. Efekat epitelizacije (zarastanja rane)

Proliferativni ili efekat epitelizacije ekstrakata herbe i korena vrste *Parietaria officinalis* je ispitan posmatranjem uticaja samih ekstrakata na brzinu rasta ćelija tj. "zatvaranje rane".

Postupak

Epitelne ćelije intestinalnog trakta pacova (IEC18) su zasejane u mikropločama od 12 polja do postizanja monosloja. Ćelije su isprane, medijum zamenjen i u svakom polju su napravljene tri "rane" tj. monosloj je povređen presecanjem sa vrhom sterilnog nastavka. U tri polja u kojima je bio samo medijum su služila kao kontrola (*Slika 3.13.*), ekstrakti herbe (radna koncentracija 10 µg/mL) i korena (radna koncentracija 5 µg/mL) su takođe urađeni u tri ponavljanja (polja). Kada je eksperiment postavljen, ćelije tačnije, mesta proreza (površina koja nije prekrivena ćelijama) su posmatrana i fotografisana (Microscope DFC290 HD, softver - LAS Version 4.3.0) pri uvećanju od 40x a nakon toga mikroploča je vraćena u inkubator i svakih 2h proveravano je da li je došlo do "zatvaranja rana". Nakon 9h inkubacije, mesta proreza su ponovo fotografisana. Relativne površine (RP) proreza su određene u programu Image J,

razlikom RP na početku i nakon 9 sati dobijena je relativna površina koju su prekrile novoizrasle ćelije. Poređenjem te površine kod kontrole i proba sa ekstraktima, utvrđeno je gde dolazi do brže epitelizacije.



Slika 3.13. Šema mikroploče u testu epitelizacije (zarastanja rane).

3.9. Određivanje sadržaja teških metala i fizioloških parametara u herbi koprive (*Urtica dioica* L.)

Princip

Kopriva (*Urtica dioica* L.) kao samonikla vrsta, široko rasprostranjena kako u urbanim tako i u ruralnim sredinama predstavlja pogodan potencijalni bio-indikator zagađenja. U te svrhe, odabrana su dva lokaliteta jedan, nezagađen, na obodu šume i drugi, pored prometne saobraćajnice gde je biljka bila izložena svakodnevnom vazдушnom zagađenju. U okviru fizioloških parametara biljke određen je intenzitet fotosinteze, transpiracija i efikasnost korišćenja vode, kao i količina fotosintetičkih pigmenta: hlorofila a, hlorofila b, ukupnih hlorofila i karotenoida. Za procenu akumulacije teških metala, određena je količina sledećih elemenata u osušenom biljnom materijalu: Al, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Mo, Cd, Sn, Sb, Hg i Pb. Od biljnog materijala iz kog su određeni ovi parametri, za dalja ispitivanja biološkog potencijala koprive sa lokaliteta različite zagađenosti, napravljeni su metanolni ekstrakti (U.dioica3 i U.dioica4) i urađeni testovi za procenu njihove antioksidantne i antiinflamatorne aktivnosti (eksperimentalni postupci dati u prethodnim poglavljima).

Postupak

Intenzitet fotosinteze i transpiracije su određeni pomoću LK pro+ prenosnog fotosintetičkog sistema (eng. *LC Pro+ Portable Photosynthesis System*), proizvođača ADC BioScientific Ltd na terenu na intaktnim (živim) listovima. Svetlosni uslovi su postavljeni pomoću LC Pro+ svetlosne jedinice koja emituje fotosintetički aktivno zračenje (FAR) $1000 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Transpiracija, provodljivost stoma i koncentracija CO_2 u stominoj duplji su određene tako što je vazдушna jedinica LC Pro+ omogućavala protok okolnog vazduha do lisne komore konstantnom brzinom od 100 mmol s^{-1} . Vlaga je postavljena na 10 mbar parcijalnog pritiska vode. Temperatura i koncentracija CO_2 su odgovarali uslovima spoljašnje sredine. Efikasnost korišćenja vode ili parametar WUE (eng. *water use efficiency*) je izračunat kao odnos intenziteta fotosinteze i transpiracije i izražen u jedinicama $\text{mmolCO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1} / \text{mmolH}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Za određivanje koncentracije teških metala u uzorcima, priprema istih je vršena metodom vlažne digestije u sistemu Ethos, Microwave Labstation, Milestone. Kvantifikacija elemenata je vršena tehnikom indukovan kuplovane plazme (eng. *ICP - inductively coupled plasma*) sa agronom kao protočnim gasom na uređaju Agilent 7700x Series ICP-MS. Obrada podataka je vršena u softveru MassHunter Workstation i rezultati prikazani kao mg elementa po kg suvog biljnog materijala.

Koncentracija fotosintetičkih pigmenata (hlorofila a, hlorofila b, ukupnih hlorofila i karotenoida) određena je spektrofotometrijski (UV-VIS spektrofotometar, model DU-65, Beckman) iz acetonskog ekstrakta (0,2 g biljnog materijala u 25 ml 100 %-nog acetona), merenjem apsorbance na 662 nm (hlorofil a), 644 nm (hlorofil b) i 440 nm (karotenoidi).

Rezultati su izračunati formulama po Wettstein-u (1957) i izraženi kao mg/g suve materije:

$$C_a = 12,7 \times A_{662} - 2,7 \times A_{644}$$

$$C_b = 22,9 \times A_{644} - 4,7 \times A_{662}$$

$$C_{\text{karotenoidi}} = 4,695 \times A_{440} \text{ (mg/g)}$$

4. Rezultati i diskusija

4.1. HEMIJSKI SASTAV EKSTRAKATA ISPITIVANIH VRSTA

U okviru ove doktorske disertacije izvršena je analiza hemijskog sastava ekstrakata 6 biljnih vrsta koje pripadaju rodovima *Urtica* (*U. dioica* i *U. kioviensis*) i *Parietaria* (*P. officinalis*, *P. judaica*, *P. lusitanica* i *P. serbica*). Literaturni podaci o hemijskom sastavu većine ovih vrsta su veoma oskudni, izuzev vrste *U. dioica*. U ekstraktima herbi koprive do sada je identifikovano deset fenolnih kiselina i njihovih derivata, 14 flavonoida i njihovih glikozida a u ekstraktima korena nađeno je šest lignanskih i deset terpenskih jedinjenja (*Tabela 2.1.* i *2.2.*, poglavlje *2.2.*). U cilju analize hemijskog sastava odabranih ekstrakata primenjene su sledeće instrumentalne metode:

- kvalitativna analiza primenom tečnehromatografskih metoda (LC-DAD-MS i LC-MS/MS);
- kvantitativna analiza odabranih fenolnih jedinjenja primenom LC-MS/MS tehnike;
- spektrofotometrijske metode za određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja (u reakciji sa Folin-Ciocalteu reagensom) i ukupnih hidroksilovanih flavonoida (u reakciji formiranja kompleksa sa Al^{3+} jonima)

Kvalitativna (LC-DAD-MS i LC-MS/MS) analiza je izvršena je za odabrane metanolne ekstrakte herbi i korena svake vrste (za svaku vrstu odabrani su ekstrakti sa samo jednog lokaliteta) dok su primenom kvantitativne LC-MS/MS analize određene fenolne komponente u metanolnim ekstraktima biljnih organa (herba, koren, list, cvet i stabljika) i vodenim ekstraktima (infuzima) herbi ispitivanih vrsta sa svih lokaliteta. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola i flavonoida je rađeno u metanolnim ekstraktima herbi, korena i lista ispitivanih vrsta sa svih lokaliteta kao i infuzima herbi i korena odabranih vrsta.

4.1.1. Kvalitativna LC-DAD-MS i LC-MS/MS analiza

Za kvalitativnu analizu ekstrakata korišćena je reverznofazna tečna hromatografija (RP-HPLC) kuplovana sa UV/VIS i tandemskom masenom spektrometrijom. Razmatrano je više metoda za određivanje sekundarnih biomolekula (sa akcentom na biljnim fenolima) u biljnim ekstraktima. Postoji mnogo spektrofotometrijskih metoda za određivanje biljnih fenola, veoma brzih i ekonomičnih, međutim, te metode su nespecifične i ne daju gotovo nikakve podatke o kvalitativnom sastavu. Zbog slabe isparljivosti većine biljnih fenola, korišćenje gasne hromatografije bi zahtevalo dodatnu derivatizaciju uzorka, što komplikuje proceduru i uvodi dodatne greške. Kako LC ne zahteva detaljno prečišćavanje uzorka niti bilo kakvu derivatizaciju, a primenom savremenih kolona sa česticama tipično 1,8 μm postiže jako dobro razdvajanje velikog broja komponenti, ova HPLC (eng. *high performance liquid chromatography*) tehnika je sve popularnija u oblasti identifikacije i kvantitacije sekundarnih biomolekula. Dodatno, kuplovanje HPLC tehnike sa tehnikom masene spektrometrije koja je veoma selektivna i visoko osetljiva, pruža bitne informacije o samoj strukturi analiziranih komponenti (Cuyckens i sar, 2004; Muth i sar, 2008).

Korišćena je binarna mobilna faza za analizu svih ekstrakata, sastavljena od 0,05 % vodenog rastvora HCOOH (A) i MeOH (B) kao organskog modifikatora. Kiselina je dodata radi smanjivanja jonizacije fenolnih i karboksilnih grupa i stoga manjeg tail-ovanja pikova (bolja simetrija) i radi lakšeg formiranja željenih $[M+H]^+$ adukta u PI. Koncentracija kiseline odabrana je tako da daje zadovoljavajuću osetljivost u PI, i ne dovodi do značajne supresije u NI (Orčić, 2010).

Korišćena kombinacija kolone i mobilne faze rezultovala je zadovoljavajućim razdvajanjem velikog broja primarnih i sekundarnih biomolekula, uz kratko vreme analize. U hromatogramima se može uočiti jasno grupisanje jedinjenja po klasama: fenolne kiseline eluiraju u približnom intervalu 0,5 - 1,2

min, flavonoidni glikozidi 1,2 - 2,9 min, lignani 2,3 - 2,7 min, aminoacil-konjugati 3,2 - 5,0 min, masne kiseline 9 - 10 min.

Analiziranje svih uzoraka vršeno je u oba polariteta. Naime, negativan mod ima bolju osetljivost za ciljane biljne fenole ali pozitivna jonizacija pruža informativnije masene spektre. Takođe, poređenjem oba spektra moguće je dodatno potvrditi molekulska masu jedinjenja. Na osnovu MS¹ (MS2Scan) spektara tj. nastalih adukata je određivana molekulska masa jedinjenja. U zavisnosti od strukture jedinjenja i sastava mobilne faza mogu nastati sledeći adukti: [M+H]⁺, [M+NH₄]⁺, [M+Na]⁺, [M+K]⁺, [2M+H]⁺, [2M+Na]⁺ u pozitivnom modu, odnosno [M-H]⁻, [M+Cl]⁻, [M+HCOO]⁻, [2M-H]⁻ itd. u negativnom modu. U cilju dobijanja jasnijih spektara, iz BPC hromatograma su eliminisani joni artefakata i tu u negativnom modu joni masa: 212, 249 i 279; a u pozitivnom: 149, 158, 214, 236, 267, 391 i 413.

Nakon utvrđivanja molekulske mase, za dobijanje detaljnijih informacija, primenjeni su MSⁿ eksperimenti. Za sve pikove kojima je određena molekulska masa, snimljeni su MS² spektri [M+H]⁺ jona ako je bilo moguće, ili alternativno adukta sa amonijum-jonom ili sa jonima alkalnih metala u PI, kao i [M-H]⁻ jona ili adukta sa formijatom u NI. Podaci o dobijenim UV, MS¹ i MS² spektrima su dati u *Tabeli 8.3. u Prilogu 8.3.*, a slike UV, MS¹ i MS² spektara su priložene u *Dodatnom materijalu* na CD-u. Potrebno je naglasiti da su za snimanje MS² spektrara poželjni protonovani i deprotonovani adukti jer ostali adukti vrlo teško podležu fragmentaciji. Za akviziciju MS² spektara korišćen je Product Ion Scan mod, koji obuhvata filtraciju željenog prekursora od koeluirajućih jona na prvom kvadrupolu (Q1), kolizijom-indukovanu disocijaciju (CID) usled sudara sa molekulima azota i zatim skeniranje nastalih fragmenata na Q3. Snimanje je vršeno pri četiri različite kolizione energije (10-40V, sa inkrementima od 10V). Dodatno, za neke komponente su snimljeni i pseudo-MS³ spektri odabranih fragmenata detektovanih u MS² spektrima. Pseudo-MS³ spektri dobijeni su primenom visokog napona fragmentora (napona između ulazne kapilare i skimera) koji dovodi do *in-source* fragmentacije (CID u jonskom izvoru); nastali fragmenti dalje se u QqQ analizatoru tretiraju kao prekursori.

4.1.2. Identifikovana jedinjenja po klasama

Primenom tehnike reverznofazne tečne hromatografije kuplovane sa UV/VIS i tandemskom masenom spektrometrijom su uspešno razdvojene i identifikovane grupe jedinjenja u metanolnim ekstraktima ispitivanih vrsta: fenolne kiseline, flavonoidni glikozidi, lignani, aminoacil-konjugati, jedinjenja Mw = 310-330 i masne kiseline. U narednim poglavljima biće objašnjena interpretacija spektara i predložene fragmentacije pojedinih jedinjenja po navedenim grupama.

4.1.2.1. Fenolne kiseline i njihovi derivati

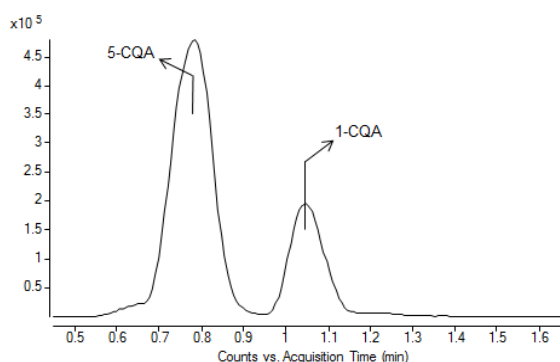
Identifikovano je šest fenolnih kiselina, odnosno, njihovih derivata u analiziranim ekstraktima i to pretežno u herbama (*Tabela 4.1.*). U ekstraktima korenja, od jedinjenja koja pripadaju ovoj klasi detektovane su samo hinska kiselina, derivat kafene kiseline - *N*-kafeoil-*L*-DOPA (klovamid) i 5-*O*-kafeoilhinska kiselina.

Hinska (P2), *p*-kumarinska (P25) i kafena kiselina su identifikovane poređenjem retencionog vremena, UV, MS¹ i MS² spektra sa referentnim standardima.

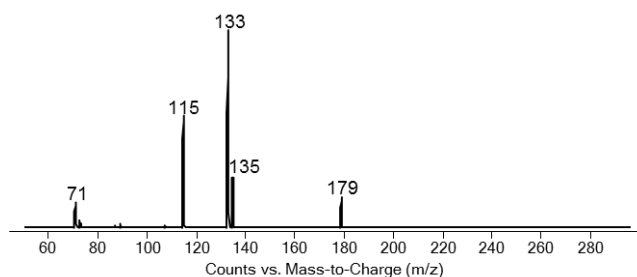
Tabela 4.1. Fenolne kiseline i njihovi derivati identifikovani u ispitivanim metanolnim ekstraktima.

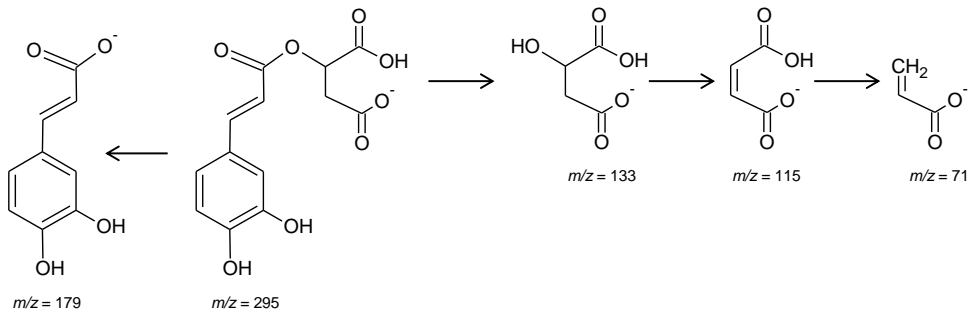
Pik	t_r (min)	Mw	Naziv jedinjenja	<i>U.dio1 (pub)</i>		<i>U. kioviensis</i>		<i>P. judaica1</i>		<i>P. lusitanica1</i>		<i>P. officinalis2</i>	
				H	K	H	K	H	K	H	K	H	K
P2	0.52	192	hinska kiselina	x	x	x		x		x	x		
P9a	0.80	354	5- <i>O</i> -kafeoilhinska kiselina	x		x							
P9b	1.08	354	1- <i>O</i> -kafeoilhinska kiselina	x		x							
P11	0.89	296	kafeoil-jabučna kiselina								x		
P17	1.08	296	kafeoil-jabučna kiselina	x				x		x			
P18	1.16	359	kafeoil-DOPA (klovamid)		x								
P25	1.62	164	<i>p</i> -kumarinska kiselina	x									

U ekstraktima herbi *Urtica* vrsta detektovana su dva jedinjenja mase 354 (P9a i P9b) koja odgovaraju kafeoilhinskim kiselinama (CQA). U PI MS² se uočava jon $m/z = 163$ koji predstavlja acilijum-jon kafene kiseline. U Product Ion Scan-u za prekursor $m/z = 353$ u NI uočava se kod oba pika samo jon od $m/z = 191$ (anjon hinske kiseline), te je zaključeno da su u pitanju 1-*O*- i 5-*O*-kafeoilhinska kiselina (u slučaju ostalih izomera monokafeoilhinskih kiselina, 3- i 4-CQA, uočavaju se i joni $m/z = 179$ i 173). Poređenjem sa retencionim vremenom standarda 5-CQA, utvrđeno je eluira na 0,8 min (*Slika 4.1.*), pa je drugi izomer kafeoilhinske kiseline koji ima retenciono vreme 1,05 identifikovan kao 1-CQA. (Clifford i sar, 2005).

**Slika 4.1.** Product Ion Scan hromatogram reprezentativnog uzorka (ekstrakt *U.dio1(pub)* - herba), za prekursor $m/z = 353$ u NI, sa označenim pikovima izomera kafeoilhinske kiseline.

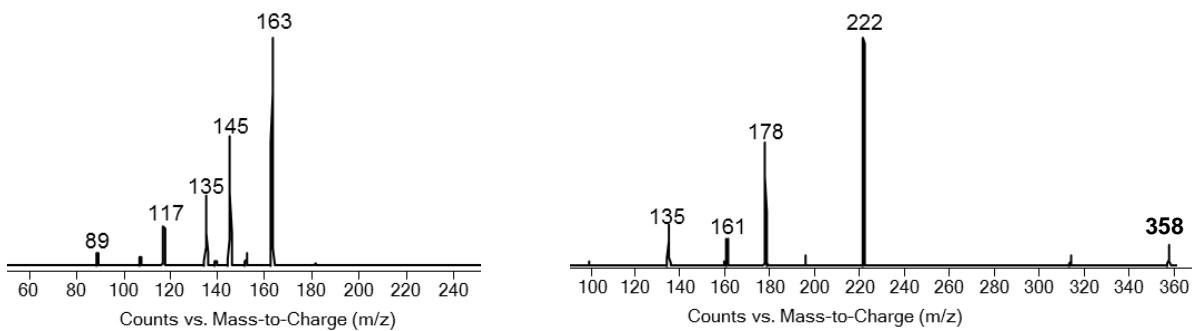
Pik P18 mase 296 odgovara kafeoil-jabučnoj kiselini, koja je i prema radu Budzianowsk-og (1990) nađena u ekstraktu herbe vrste *Urtica dioica*. U PI MS² se uočava jon $m/z = 163$ koji predstavlja acilijum-jon kafene kiseline dok se u NI uočavaju sledeći fragmenti (*Slika 4.2.*): $m/z = 179$ [Kaf-H]⁻, 135 [Kaf-H-CO₂]⁻, 133 [Jab-H]⁻, 115 [Jab-H-H₂O]⁻, 71 [Jab-H-H₂O-CO₂]⁻ koji odgovaraju pretpostavljenom obrascu fragmentacije ove komponente (*Slika 4.3.*).

**Slika 4.2.** ESI(-) MS² spektar kafeoil-jabučne kiseline pri kolizionoj energiji od 20 V.

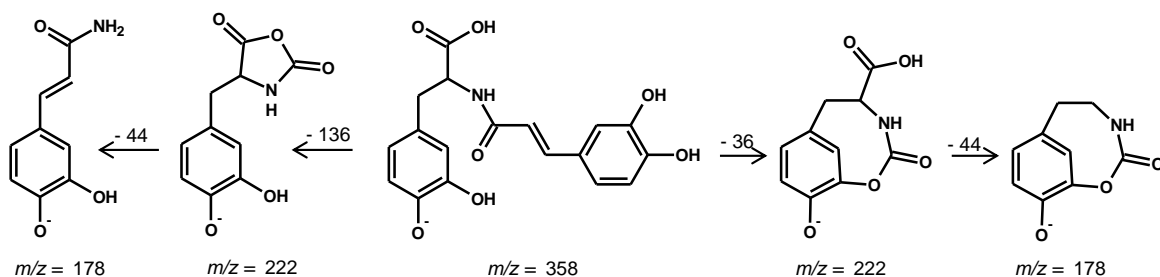


Slika 4.3. Pretpostavljeni obrazac fragmentacije kafeoil-jabučne kiseline.

U ekstraktu korena vrste *U. dioica* identifikovan je derivat kafene kiseline i označen kao pik P18. U NI MS¹ spektru su detektovani joni 717 [2M-H]⁻ i 358 [M-H]⁻ a u PI se javlja adukt 360 [M+H]⁺ što ukazuje na molekulsku masu od 359, i s obzirom da je neparna, ukazuje na prisustvo neparnog broja atoma azota u molekulu. Opet se u PI MS² spektrima uočava jon $m/z = 163$ (acilijum jon kafene kiseline) a prisutni su i ostali fragmenti kafene kiseline $m/z = 145, 135, 117$ i 89 (Slika 4.4. - levo). NI spektar datog jedinjenja je bio instruktivniji prikazujući fragmente $m/z = 222, 178, 161, 135$ (Slika 4.4. - desno). Prema radu Arloria i saradnika (2008) ovakav obrazac fragmentacije (Slika 4.5.) odgovara jedinjenju *N*-kafeoil-*L*-DOPA, koje je izolovano iz semena kakaovca i nazvano klovamid. Ovi rezultati, po prvi put dokazuju, prisustvo klovamida u ekstraktu korena koprive.



Slika 4.4. ESI(+)-MS² (levo) i ESI(-)-MS² (desno) spektri (*N*-kafeoil-*L*-DOPA) pri kolizionim energijama od 30 i 10V



Slika 4.5. Pretpostavljeni obrasci fragmentacije klovamida (*N*-kafeoil-*L*-DOPA).

4.1.2.2. Flavonoidi i njihovi glikozidi

Flavonoidi i njihovi derivati (pre svega glikozidi) su pretežno prisutni u ekstraktima herbi (Tabela 4.2.). Izuzetak je epikatehin koji se javlja isključivo u hromatogramima ekstrakata korena vrsta roda *Parietaria*. U ispitivanim ekstraktima, detektovana su oba tipa glikozida: *O*- i *C*-glikozidi; prepoznavanjem tipičnog obrazca fragmentacije za oba tipa glikozida. U slučaju *O*-glikozida raskidanjem glikozidne veze dolazi otcepljenja šećerne komponente što rezultuje gubitkom $\Delta m/z$ od 162 ukoliko je u pitanju heksoza, odnosno 146 kod deoksiheksoza. Kod *C*-glikozida ne dolazi do cepanja glikozidne veze već dolazi do

cepanja šećernog prstena što rezultuje gubitkom $\Delta m/z$ od 120 (često se vidi kao sukcesivan gubitak od 90 i 30). Interesantno je da su sva četiri detektovana C-glikozida nađena isključivo u ekstraktima vrste *U. kioviensis*.

Epikatehin (P12), viteksin (P30), rutin (P33), izokvercitrin (P35) i izoramnetin-3-*O*-rutinozid (P55) su identifikovani poređenjem retencionog vremena, UV, MS¹ i MS² spektra sa referentnim standardima i literaturnim podacima (Farag i sar, 2013). U slučaju rutina, u PI MS² spektru su prisutni joni $m/z = 465$ i 303. Jon 465 nastaje gubitkom ramnoze (611-465=146) a jon 303 predstavlja jon aglikona (Y_0^+) nastao otcepljenjem disaharida rutinoze (611-303=308; 308=146+162). Da je u pitanju rutin, dodatno je potvrđeno poređenjem UV spektra sa literaturnim podacima - λ_{max} 356 nm, ~300sh nm, 258 nm, 202 nm. U MS² spektrima izokvercitrina se javlja jon aglikona m/z (Y_0^+) = 303 i m/z (Y_0^-) = 301 ali se pored ovog jona u NI javljaju i tipični joni za kvercetin - 271 i 255. Što se tiče izoramnetin-3-*O*-rutinozida, u MS² spektrima su prisutni joni aglikona m/z (Y_0^+) = 317 i m/z (Y_0^-) = 315, i u PI se javlja gubitak od 15 (317-302=15) što ukazuje na gubitak metil-radikala, odnosno, prisustvo metoksi grupe u molekulu. Bitno je naglasiti da se ovo jedinjenje nalazi isključivo u ekstraktima herbi vrsta roda *Parietaria*.

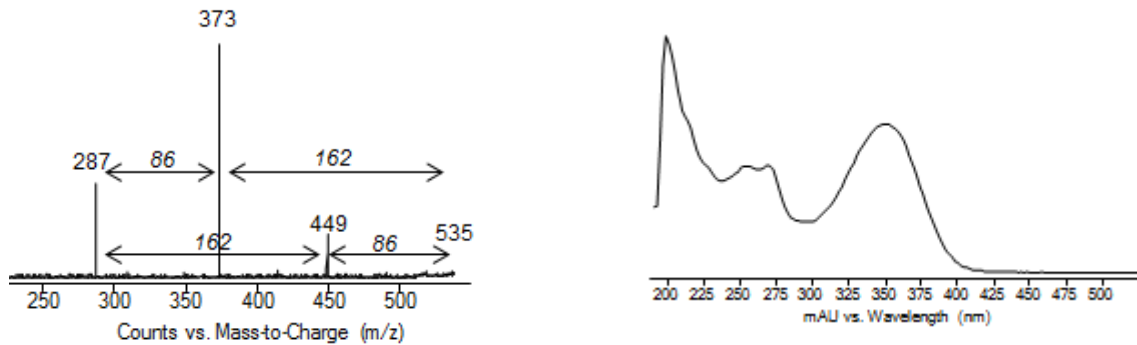
Tabela 4.2. Flavonoidi i njihovi glikozidi identifikovani u ispitivanim metanolnim ekstraktima.

Pik	t_r (min)	Mw	Naziv jedinjenja	<i>U.dio1 (pub)</i>		<i>U. kioviensis</i>		<i>P. judaica1</i>		<i>P.lusitana1</i>		<i>P.officinalis2</i>	
				H	K	H	K	H	K	H	K	H	K
P12	0.94	290	epikatehin						x		x		x
P19	1.19	624	krizoeriol-C-diheksozid				x						
P20	1.30	679	[371]-dHex-Hex					x					
P24	1.52	448	luteolin-C-heksozid				x						
P30	2.03	432	viteksin				x						
P33	2.12	610	rutin	x				x		x			x
P35	2.18	464	izokvercitrin (kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid)							x			
P36	2.20	462	krizoeriol-C-heksozid				x						
P48	2.71	594	kemferol/luteolin-3- <i>O</i> -rutinozid	x				x					x
P50	2.78	534	luteolin-(malonil)-(heksozid)				x						
P53	2.87	478	izoramnetin-heksozid	x									
P54	2.88	608	<i>O</i> -Me luteolin-(dHex-Hex)				x						
P55	2.89	624	Izoramnetin-3- <i>O</i> -rutinozid						x		x		x

Pik P48 se javlja u hromatogramima ekstrakata herbi *U. dio1 (pub)*, *P. judaica1* i *P. officinalis2*. U PI MS² spektru javljaju se joni $m/z = 449$ i 287. Prvi jon m/z (Y_1^+) = 449 nastaje nakon gubitka deoksiheksoze (595-449=146) a drugi nakon otcepljenja i drugog šećera, ovoga puta heksoze (449-287=162), i predstavlja jon aglikona, m/z (Y_0^+) = 287 a u NI i m/z (Y_0^-) = 285. Kako molekulska masa aglikona od 286 odgovara velikom broju poznatih flavonoida, nakon konsultovanja literature, izbor je sužen na kemferol odnosno luteolin kao jedne od najčešćih flavonoida. Dodatno, prethodnim istraživanjima potvrđeno je prisustvo glikozida kemferola i luteolina u ekstraktima vrsta iz ove familije. Nije bilo moguće pouzdano utvrditi koji od ova dva aglikona je u pitanju jer se razlikuju samo po UV spektru, kog nije bilo moguće ekstrahovati zbog koeluirajućih komponenti. Dodatno je urađena i pseudo-MS³ analiza za jone 285 i 287 (u NI i PI, respektivno) ali dodatna fragmentacija je bila bezuspešna te ni na ovaj način nije bilo moguće diferencirati da li je u pitanju luteolin ili kemferol. Što se tiče disaharida, prema literaturi, najzastupljenija kod ovih vrsta je rutinoza vezana u položaju 3 pa se može pretpostaviti da je ovo jedinjenje kemferol/luteolin-3-*O*-rutinozid (Farag i sar, 2013).

Naredni pik u hromatogramu ekstrakta herbe *U. dioica* je identifikovan kao izoramnetin-heksozid (P53). U MS² spektrima snimljenim u pozitivnom i negativnom modu javlja se jon aglikona: m/z (Y_0^+) = 317 i m/z (Y_0^-) = 315 nakon gubitka $\Delta m/z$ od 162. Takođe je u oba MS² spektra detektovan gubitak od 15, što ukazuje na prisustvo metoksi grupe u strukturi.

U hromatogramu ekstrakta herbe vrste *U. kiviensis* identifikovana su dva jedinjenja luteolina - P50 i P54. U prvom slučaju (P50), u PI MS² spektru (Slika 4.6. - levo) uočavaju se dva gubitka od 86 i 162, odnosno malonil grupe i heksoze, respektivno. Kako su prisutna oba puta fragmentacije ($535-449=86$ i $535-373=162$) možemo zaključiti da su heksoza i maloil grupa vezani direktno na aglikon, odnosno, nije u pitanju luteolin-(malonilheksozid). Da je u pitanju luteolin kao aglikon, utvrđeno je pomoću UV spektra (Slika 4.6. - desno) - λ_{max} 350, 270, 253 kao i pseudo MS³ spektra.

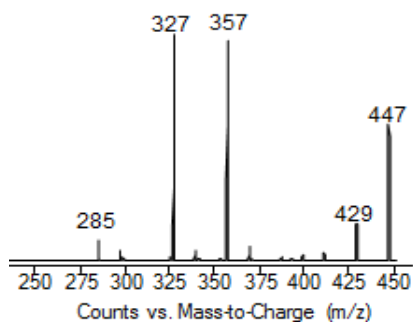


Slika 4.6. ESI(+) MS² spektar jedinjenja luteolin-(malonil)-(heksozid) pri kolizionoj energiji od 10 V (levo) i njegov UV spektar (desno).

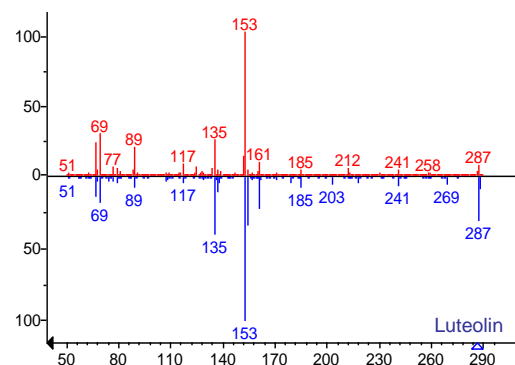
Drugo jedinjenje luteolina (P54) je identifikovano kao *O*-Me luteolin-(dHex-Hex). U PI MS² spektru jon aglikona je m/z (Y_0^+) = 301 a u NI i m/z (Y_0^-) = 299. Pošto nije prisutan jon Y_1^+ (463), verovatnije je u pitanju diozid nego diglikozid, i to najverovatnije rutinozid kao najčešći deoksiheksozilheksozid u sklopu flavonoida. Da je u pitanju luteolin ukazao je karakterističan UV spektar λ_{max} 350, 270, 253, a gubitak od $\Delta m/z$ od 15 u spektrima oba moda dokazuje da je prisutna metoksi grupa u molekulu (PI $301-286=15$; NI $299-284=15$).

Svi identifikovani C-glikozidi nađeni su isključivo u ekstraktima vrste *U. kiviensis* i označeni su kao pikovi P19, P24, P30 i P36.

Luteolin-C-heksozid (P24) u NI ima sukcesivne gubitke od 90 tj. 30, karakteristične za C-glikozide. Ovi gubitci nastaju nakon cepanja šećernog prstena i daju jone 357 i 327, kao i minorni jon aglikona m/z (Y_0^+) = 285 (Slika 4.7.). Da je u pitanju luteolin kao aglikon potvrđeno je pseudo-MS³ analizom i poređenjem dobijenog spektra sa spektrom standarda luteolina (Slika 4.8.).



Slika 4.7. ESI(-) MS² spektar luteolin-C-heksozida (P24) pri kolizionoj energiji od 10 V.

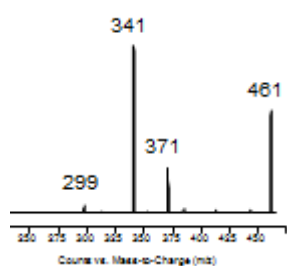


Slika 4.8. Poređenje ESI(+) pseudo MS³ spektra jona $m/z = 287$ sa spektrom standarda luteolina (donji spektar).

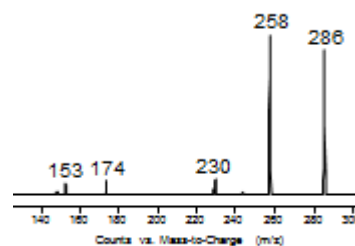
Viteksin (P30) je identifikovan na osnovu karakteristične fragmentacije *C*-glikozida i na osnovu poređenja dobijenog spektra sa spektrom standarda viteksina.

Još jedan *C*-glikozid je identifikovan na osnovu tipičnog obrasca fragmentacije. Pik P36 je u NI MS² spektru dao jone $m/z = 461$, 371 i 341 kao i jon aglikona $m/z = 299$ (Slika 4.9.). Da je u pitanju krizoeriol kao aglikon potvrđeno je snimanjem pseudo-MS³ spektra (Slika 4.10.).

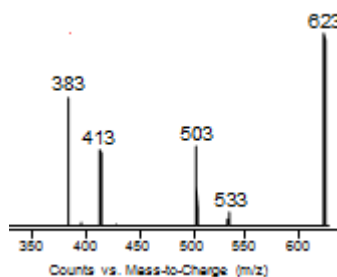
U slučaju pika P19 sa hromatograma ekstrakta korena vrste *U. kioviensis* (za razliku od ostalih nadenih u hromatogramima ekstrakta herbe te vrste), primećena su dva gubitka $\Delta m/z = 120$ (90+30) što ukazuje da je u pitanju *C*-diheksozid (Slika 4.11.). Međutim, jon aglikona m/z (Y_0^-) = 299 nije primećen u spektru niti je uspeo snimanje pseudo MS³ spektra za dati jon, te se na osnovu samo molekulske mase može jedino pretpostaviti da je u pitanju krizoeriol.



Slika 4.9. ESI(-) MS² spektar krizoeriol-*C*-heksozida (P36) pri kolizionoj energiji od 20 V.

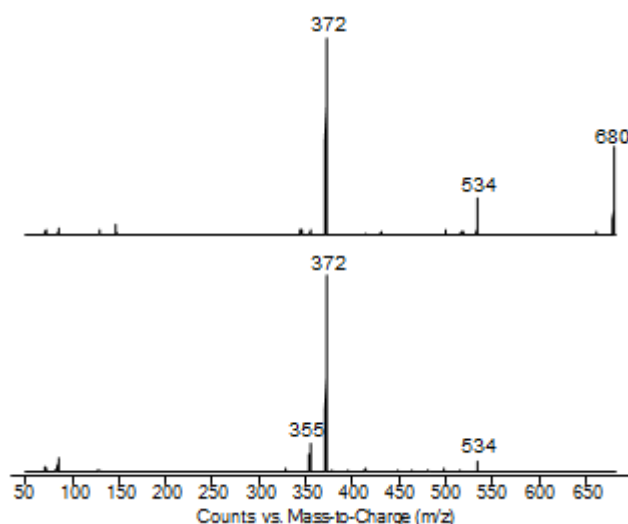


Slika 4.10. ESI(+) pseudo MS³ spektar jona $m/z = 301$ (P36), pri kolizionoj energiji od 30 V.



Slika 4.11. ESI(-) MS² spektar pika P19, pretpostavljenog krizoeriol-*C*-diheksozida pri kolizionoj energiji od 30 V

U glikozide je svrstan i pik P20 jer ima tipične gubitke $\Delta m/z$ za glikozide iako nije bilo moguće utvrditi koje je eventualna aglikonska komponenta. Kod ovog pika, u PI MS² spektru registruju se dva gubitka $\Delta m/z$ od 162 i 146 odnosno, heksoze i deoksiheksoze (Slika 4.12.). Kao jon aglikona se javlja m/z (Y_0^+) = 372, a takođe je i prisutan jon 355 koji nastaje gubitkom od 17 što ukazuje na izdvajanje amonijaka. S obzirom da je molekulska masa pretpostavljenog aglikona neparna (371) odnosno sadrži neparan broj atoma azota u strukturi, time se može objasniti izdvajanje amonijaka. Radi identifikacije aglikona, snimljen je pseudo MS³ spektar za jon 372 ali nije pružio korisne informacije.



Slika 4.12. ESI(+) MS² spektar pika P20 pri kolizionim energijama od 20 i 30 V.

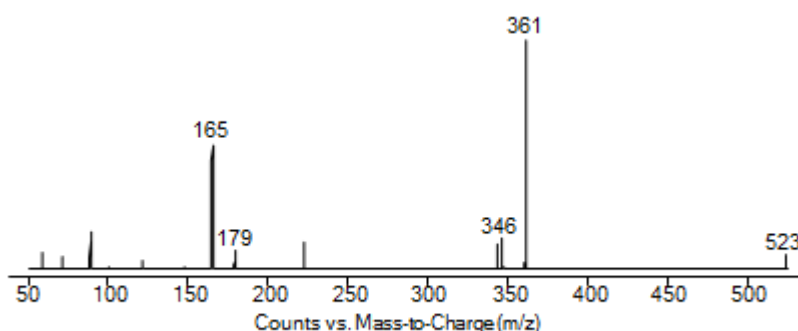
4.1.2.3. Lignani

U ekstraktima korena vrste *U. dioica*, ranijim analizama je identifikovano nekoliko lignana, pre svega, sekoizolaricirezinol, izolaricirezinol i neoolivil. (Kraus i Spittler, 1990). Saglasno tome, u okviru ovog rada, lignani su sa sigurnošću identifikovani jedino u ekstraktu korena vrste *U. dioica* i to glikozid sekoizolaricirezinola i derivati neoolivila (Tabela 4.3.). U ekstraktima vrsta roda *Parietaria* nisu identifikovana jedinjenja iz grupe lignana.

Tabela 4.3. Flavonoidi i njihovi glikozidi identifikovani u ispitivanim metanolnim ekstraktima.

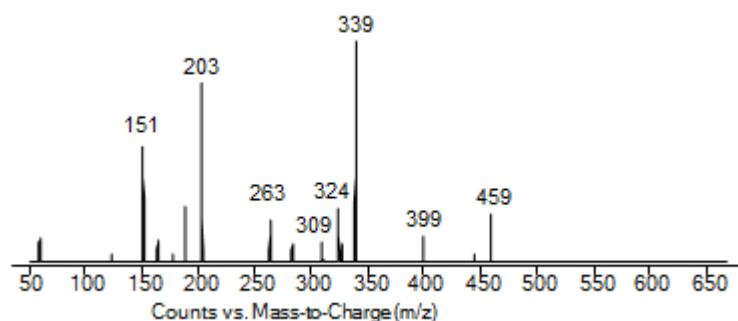
Pik	t _r (min)	Mw	Naziv jedinjenja	<i>U.dio1 (pub)</i>		<i>U. kioviensis</i>	
				H	K	H	K
P38	2.33	524	sekoizolaricirezinol-4- <i>O</i> ili 9- <i>O</i> -glukozid		x		
P47	2.70	622	9,9'-bisacetil-neoolivil-4- <i>O</i> -glukopiranozid		x		
P83	3.91	460	9,9'-bisacetil-neoolivil		x		
P94	4.32	418	neoolivil-acetat?			x	

Molekulska masa pika P38 iznosi 524 i odgovara jedinjenju sekoizolaricirezinol 4-*O*- ili 9-*O*-glukozidu. U NI MS² spektru uočava se jon aglikona m/z (Y_0^-) = 361 nastao gubitkom $\Delta m/z$ 162 što ukazuje na prisustvo heksoze u molekulu. Daljom fragmentacijom nastaju joni m/z = 346, 179, 165 (Slika 4.13.) koji se poklapaju sa jonima u spektru standarda sekoizolaricirezinola.

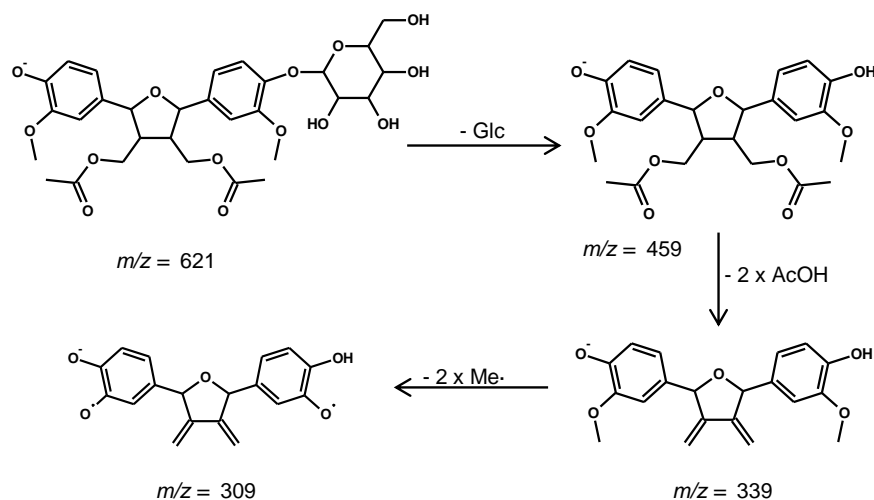


Slika 4.13. ESI(-) MS² spektar sekoizolaricirezinola 4-*O*- / 9-*O*-glukozida pri kolizionoj energiji od 40 V.

Pikovi P47, P83 i P94 su identifikovani kao derivati neoolivila. U NI MS² spektru pika P47 (Slika 4.14.) primećena su pored gubitka heksoze ($\Delta m/z = 162$) dva sukcesivna gubitka od $\Delta m/z = 60$ što ukazuje na prisustvo dve acetil grupe u strukturi molekula. Takođe, dolazi do dva sukcesivna gubitka $\Delta m/z = 15$ - prisutne su dve metoksi grupe. Na osnovu izgleda spektra i poređenja sa literaturnom (Schottner i sar, 1997b) ovo jedinjenje je identifikovano kao 9,9'-bisacetil-neoolivil-4-O-glukozid sa predloženom fragmentacijom datoj na Slici 4.15.



Slika 4.14. ESI(-) MS² spektar 9,9'-bisacetil-neoolivil-4-O-glukozida (P47) pri kolizionoj energiji od 40 V.

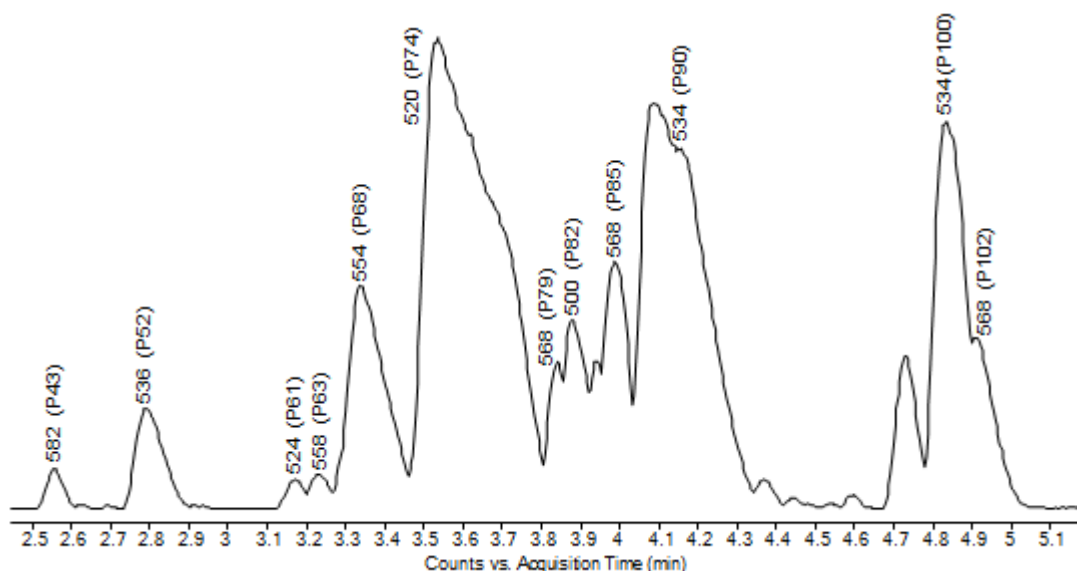


Slika 4.15. Pretpostavljen obrazac fragmentacije 9,9'-bisacetil-neoolivil-4-O-glukozida.

Pošto pik P83 ima molekulska masu 460 i NI MS² spektri se poklapaju sa spektrom prethodnog pika (osim gubitka heksoze) ovo jedinjenje je zapravo aglikon gore pomenutog jedinjenja tj. 9,9'-bisacetil-neoolivil. Detektovano je još jedno jedinjenje koje po molekularnoj masi odgovara 9-acetil-neoolivilu i u PI MS² spektru ima gubitak od $\Delta m/z = 60$ u hromatogramu ekstrakta herbe *U. kioviensis*, što nije očekivano. Međutim, snimanje NI MS² spektra nije uspelo pa nije bilo moguće sa sigurnošću utvrditi da li u pitanju još jedan derivat neoolivila.

4.1.2.4. Aminoacil-derivati

U hromatogramima ekstrakata herbi a naročito korenja *Parietaria* vrsta uočava se grupa pikova molekulske mase 500 - 582 koji eluiraju u regionu 2,5 - 5,0 min (Slika 4.16.). Kao što se vidi iz Tabele 4.4. ove komponente su prisutne isključivo u hromatogramima ekstrakata vrsta iz roda *Parietaria*. S obzirom da nisu bili dostupni nikakvi literaturni podaci da su ova jedinjenja ranije detektovana i identifikovana u ovim vrstama, identifikacija istih zavisila je isključivo od tumačenja snimljenih spektara.



Slika 4.16. Reprezentativni BPC hromatogram ekstrakta korena *P. judaica*.
Region u kome eluiraju aminoacil-konjugati. Scan, ESI(+).

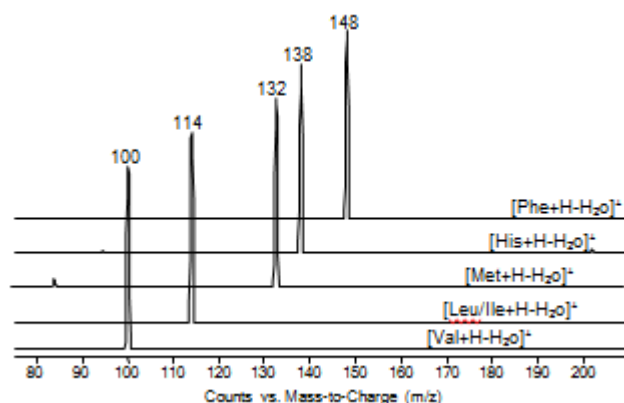
Prema obliku pikova na *Slici 4.16.*, naročito pika P74, evidentno je da su ove komponente prisutne u veoma visokim koncentracijama u ekstraktima vrsta roda *Parietaria*.

Tabela 4.4. Aminoacil-derivati identifikovani u metanolnim ekstraktima vrsta roda *Parietaria*.

Pik	t_r (min)	Mw	Oznaka jedinjenja*	<i>P. judaica</i> 1		<i>P. lusitanica</i> 1		<i>P. officinalis</i> 2	
				H	K	H	K	H	K
P43	2.55	582	[481•Val] ⁻		x		x		x
P52	2.84	536	[297•His•Val] ⁻		x		x		x
P61	3.18	524	[247•His•His] ⁻		x				x
P63	3.25	558	[281•His•His] ⁻		x		x		x
P68	3.42	554	[281•172•Val] ⁻		x		x		x
P74	3.58	520	[281•His•Val] ⁻		x		x		x
P75	3.66	552	[247•(172)•Met] ⁻			x			
P79	3.84	568	[281•172•Leu] ⁻		x				
P80	3.84	500	[247•His•Leu] ⁻						x
P81	3.89	520	[281•His•Val] ⁻	x		x		x	
P82	3.91	500	[247•His•Leu] ⁻		x		x		
P85	3.99	568	[281•His•Phe] ⁻		x		x		x
P87	4.07	500	[247•His•Leu] ⁻			x		x	
P90	4.15	534	[281•His•Leu] ⁻		x		x		x
P95	4.33	534	[281•His•Leu] ⁻	x		x			
P100	4.83	534	[247•His•Phe] ⁻		x				
P102	4.91	568	[281•His•Phe] ⁻		x		x		x
P103	4.96	534	[247•His•Phe] ⁻	x					

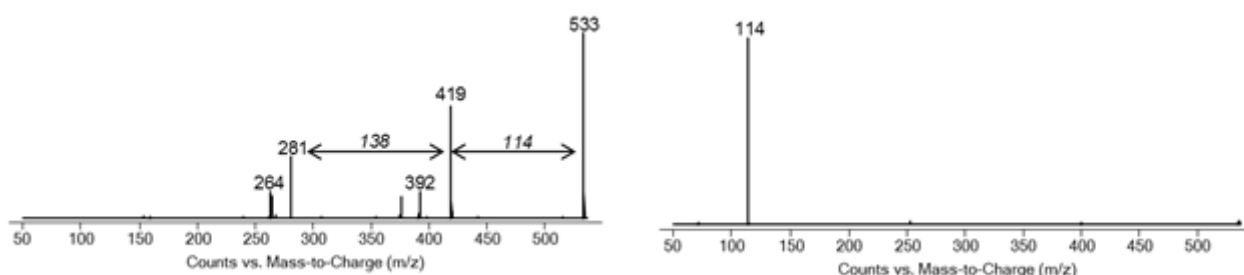
*oznaka se sastoji iz broja koji predstavlja masu jona nastalog nakon sukcesivnih gubitaka dva navedena aminokiselinska ostatka (u NI).

Jedinjenja ove grupe nisu pokazala UV aktivnost, pa se može zaključiti da nisu u pitanju aromatične strukture. PI MS² spektre svih jedinjenja karakteriše prisustvo samo jednog jona pri sve četiri kolizionije energije. Ukupno je detektovano pet jonova (kod različitih jedinjenja) u PI MS² spektrima mase $m/z = 100, 114, 132, 138$ i 148 (Slika 4.17.).

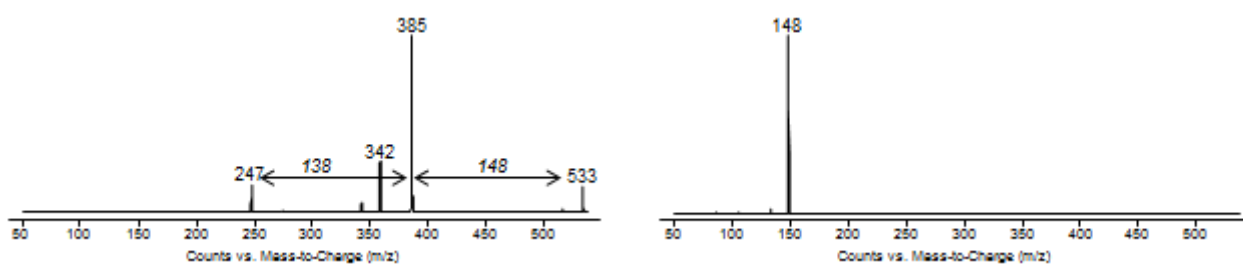


Slika 4.17. Sumarni prikaz ESI(+) MS² spektara pikova P74, P82, P75, P63 i P102 pri kolizionoj energiji od 10 V

Takođe, kod svih NI MS² spektara jedinjenja ove grupe uočen je gubitak mase jona iz PI, primeri su dati na Slikama 4.18. i 4.19. Drugi gubitak u NI MS² spektru, kod većine jedinjenja, je bio $\Delta m/z = 138$.

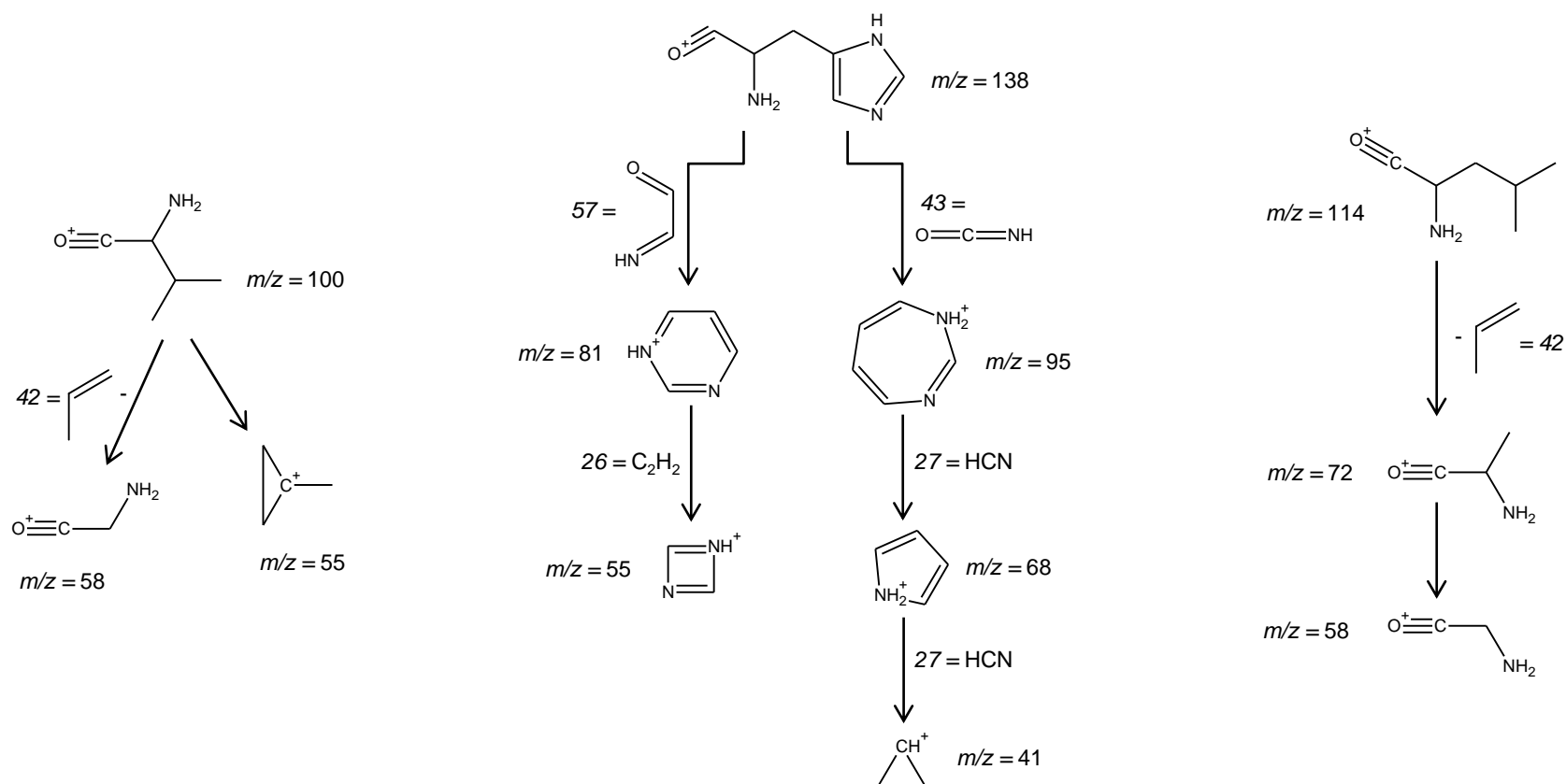


Slika 4.18. ESI(-) MS² (levo) i ESI(+) MS² (desno) spektri pika P90 pri kolizionoj energiji od 20 V



Slika 4.19. ESI(-) MS² (levo) i ESI(+) MS² (desno) spektri pika P100 pri kolizionoj energiji od 20 V.

S obzirom da joni supstituenata, prisutni u PI MS² spektrima, imaju parni odnos m/z , sami supstituenti imaju neparnu Mw, odnosno neparan broj atoma azota u strukturi. Na osnovu molekulske mase, pretpostavljeno je da su u pitanju acilijum-joni aminokiselina, odnosno, identifikovana jedinjenja predstavljaju aminoacil-konjugate. Radi potvrde ove hipoteze, snimljeni su pseudo-MS³ spektri svih gore pomenutih jona (u PI) čime je ta hipoteza i potvrđena. Rezultati pseudo-MS³ analize su dati u Tabeli 4.5. i prema izgledu dobijenih spektara predložena je fragmentacija nađenih acilijum-jona (Slika 4.20.).



Slika 4.20. Pretpostavljeni obrasci fragmentacije aminoacyl jona valina, histidina i leucina.

Tabela 4.5. Dominantne jonske vrste u PI pseudo-MS³ spektrima aminoacil jona.

<i>m/z</i>	Aminoacil jon	V _{frag} (PI)	Dominantne jonske vrste
100	[Val+H-H ₂ O] ⁺	10	100(48), 85(100) , 70(37), 58(8), 55(36), 44(91)
114	[Leu+H-H ₂ O] ⁺	10	114(10), 72(100) , 58(44), 43(21)
132	[Met+H-H ₂ O] ⁺	-	-
138	[His+H-H ₂ O] ⁺	30	95(100) , 81(33), 68(54), 54(10), 41(32)
148	[Phe+H-H ₂ O] ⁺	20	148(27), 133(100) , 132(50), 105(29), 104(14), 91(46), 79(8)

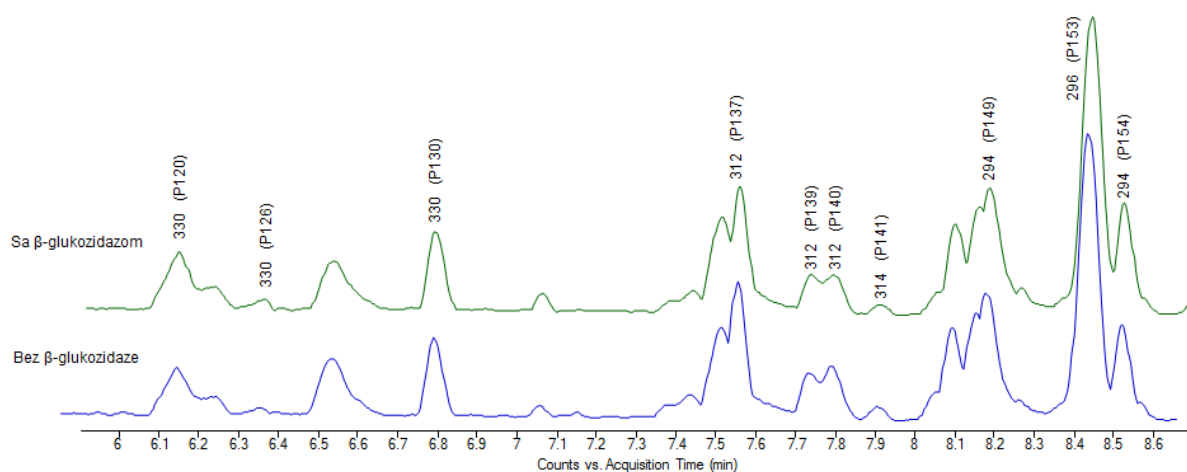
U ovom trenutku nije bilo moguće identifikovati osnovni skelet (u NI *m/z* = 247 i 281), za koji su vezane aminokiseline tako da je za dalju karakterizaciju ovih komponenti potrebno uraditi frakcionisanje ekstrakta bogatog ovim jedinjenjima u cilju dobijanja čistijih pojedinačnih komponenti i njihove dalje analize.

4.1.2.5. Komponente Mw = 310 - 330

U hromatogramima svih ekstrakata (Tabela 4.6.), detektovane su komponente Mr = 310 - 330, koje imaju slične MS² spektre tj. joni *m/z* = 229, 211, 171, 139(137) se javljaju u svim spektrima u NI modu. Na osnovu toga su grupisani i predstavljeni zajedno u ovom poglavlju. Ovoj grupi su priključena i četiri jedinjenja molekulske masa 294 i 296 jer dele iste jone u NI MS² spektrima kao pomenute komponente. Pretraživanjem literature nađeno je da su u ekstraktima korena vrste *U. dioica* detektovana jedinjenja ovih molekulske masa (312, 314, 328 i 330) i da su okarakterisani kao glukozidi pinen-diola. (Farag i sar, 2013; Kraus i Spitteller, 1991). Međutim, kako u MS² spektrima nijedne od ovih komponenti nije uočen gubitak $\Delta m/z$ od 162 koji je očekivan za glukozide, nije se sa sigurnošću moglo tvrditi da su u pitanju glukozidi pomenutog terpena.

U cilju provere da li su zaista u pitanju glukozidi, urađena je proba sa enzimom β -glukozidazom koja vrši hidrolizu velike većine glikozidnih veza (Suknović, 2011). Ideja je da se tretiranjem da enzimom raskinu glikozidne veze pri čemu, nakon hidrolize, u hromatogramu ne bi bili prisutni pikovi glikozida već bi se pojavili joni aglikona.

Tri ekstrakta (*U. dio1 (pub)* - herba, *U. dio1 (pub)* - koren i *P. officinalis2* - herba) su inkubirana sa ovim enzimom u toku 48h na temperaturi od 37°C. Na isti način su tretirane i kontrole (inkubacija, rastvarač) ali bez prisustva samog enzima. Nakon inkubacije su snimljeni Scan hromatogrami, na ovaj način pripremljenih ekstrakata, pri čemu su u njima pikovi gore pomenutih jedinjenja bili prisutni i u kontroli i u probi sa enzimom kao što se jasno vidi sa Slike 4.21.

**Slika 4.21.** BPC hromatogrami ekstrakta korena *U. dio1 (pub)*, tretiranog sa i bez β -glukozidaze. Scan, ESI(+).

Dobijenim rezultatom su opovrgnute tvrdnje iz rada Farag i sar (2013), gde je navedeno da jedinjenja molekularnih masa 328 i 330, koji u NI MS² spektrima imaju sledeće jone: 229(47), 211(100), i 171(53), odnosno 229(45), 211(100), i 171(35) jesu pinen-ol-*O*-glukozid, odnosno 2-pinen-9-ol-*O*-glukozid. Na žalost, dobijeni spektri nisu bili dovoljni za identifikaciju ovih komponenti.

Tabela 4.6. Komponente Mw = 310 – 330 identifikovane u ispitivanim metanolnim ekstraktima.

Pik	t _r (min)	Mw	<i>U.dio1 (pub)</i>		<i>U. kioviensis</i>		<i>P. judaica1</i>		<i>P.lusitana1</i>		<i>P.officinalis2</i>	
			H	K	H	K	H	K	H	K	H	K
P112	5.58	328	x						x			
P114	5.66	328	x	x	x				x		x	
P117	5.72	328							x		x	
P119	5.84	328	x		x							
P120	6.13	330	x	x	x	x		x	x	x	x	x
P122	6.22	328	x		x							
P123	6.24	330				x						
P126	6.35	330		x								
P128	6.54	310	x					x				
P129	6.71	310	x					x				
P130	6.78	330	x	x	x	x						
P131	6.86	314						x				
P132	7.07	330				x						
P134	7.35	310										x
P135	7.24	310										x
P136	7.45	310										x
P137	7.55	312		x		x						
P139	7.74	312		x		x		x		x		x
P140	7.79	312		x		x		x				x
P141	7.92	314		x								
P149	8.17	294		x								
P153	8.45	296		x		x	x	x	x	x	x	x
P154	8.53	294		x		x		x				x
P157	8.79	296		x		x						

4.1.2.6. Masne kiseline

Kvalitativni sastav masnih kiselina, do sada je određivan samo u ekstraktima vrste *U. dioica*. Rezultati predstavljeni u radu Guil-Guerrero-a i saradnika (2003) su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovom radu. Međutim, u prethodnim istraživanjima su u ekstraktima vrste *U. dioica* indentifikovane i različite hidrosilovane masne kiseline što ovom analizom nije potvrđeno (Farag i sar, 2013). O kvalitativnom sastavu masnih kiselina ostalih vrsta ispitivanih u ovom radu nije bilo podataka u literaturi.

Kvalitativan sastav masnih kiselina u je određen EIC (eng. *extracted ion chromatogram*) metodom obrade podataka tj. odabrani su samo joni m/z = 227, 253, 255, 277, 279, 281, 283, 303 Da iz Scan hromatograma u negativnom modu. Na osnovu dobijenih rezultata (Tabela 4.7.) može se zaključiti da ne postoje bitne razlike u sastavu masnih kiselina među odabranim ekstraktima vrsta familije Urticaceae.

Tabela 4.7. Fenolne kiseline i njihovi derivati identifikovani u ispitivanim metanolnim ekstraktima.

t_r (min)	[M-H] ⁻	n:d	Naziv	<i>U.dio1</i> (pub)		<i>U. kioviensis</i>		<i>P. judaica1</i>		<i>P.lusitanica1</i>		<i>P.officinalis2</i>	
				H	K	H	K	H	K	H	K	H	K
9.31	227	(14:0)	Miristinska	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
9.34	277	(18:3)	Linolenska	x	x	x	x	x	x		x	x	x
9.46	253	(16:1)	Palmitoleinska	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
9.56	279	(18:2)	Linolna	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
9.7	255	(16:0)	Palmitinska	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
9.76	305	(20:3)			x	x		x	x	x	x	x	x
9.79	281	(18:1)	Oleinska	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
10.03	283	(18:0)	Stearinska	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
10.1	309	(20:1)	Paulinska			x					x		

4.1.3. Kvantitativna LC-MS/MS analiza fenolnih jedinjenja

Primenom LC/MS-MS metode, validovane i publikovane (Orčić i sar, 2014), određen je sadržaj 45 biljnih fenola u metanolnim i vodenim ekstraktima ispitivanih vrsta. Određivana jedinjenja (45 standarda) su predstavljena u *Tabeli 4.8.* podeljena po klasama kojima pripadaju. Rezultati kvantitativne analize predstavljeni su u tabelarno (posebno za metanolne ekstrakte herbi, korenja, lista, cvasti i stabljike i vodene ekstrakte - infuze) u cilju detekcije jedinjenja koja mogu poslužiti kao hemotaksonomski markeri pri razdvajanju rodova *Urtica* i *Parietaria*, kao i samih vrsta unutar rodova. U *Tabelama 4.9., 4.10., 4.11., 4.12., 4.13. i 4.14.* rezultati su dati kao miligrami jedinjenja po gramu suvog ekstrakta, u slučaju gde su jedinjenja prešla granicu kvantitacije, oznakom det. (detektovano) gde nije dostignuta granica kvantitacije ali je premašena granica detekcije i sa n.d. (nije detektovano) gde je površina pika bila ispod granice detekcije. U *Prilogu 8.4.* date su očitane površine pikova i koncentracije detektovanih fenolnih jedinjenja izračunate iz kalibracionih krivih (*Tabele 8.5.–8.10.*).

Metanolni ekstrakti herbi

U ekstraktima svih ispitivanih herbi (*Tabela 4.9.*) se primećuje potpuno odsustvo flavonskih, flavanonskih i flavonolskih aglikona, ali su u herbama roda *Parietaria* detektovani flavan-3-oli: katehin i epikatehin. Iako aglikonske komponente nisu detektovane, prisutni su brojni glikozidi: 7-*O*-glikozidi apigenina i luteolina kao i 3-*O*-glikozidi kemferola i kvercetina. U ekstraktu herbe vrste *U. kioviensis* detektovan je i kvercetin-3-*O*-galaktozid (hiperozid) i C-glikozid apigenina - viteksin. Najzastupljeniji glikozid u svim herbama je 3-*O*-rutinozid kvercetina - rutin, u koncentraciji čak i do 15 mg/g suvog ekstrakta. Od C₆-C₁ kiselina detektovana su 4 jedinjenja od kojih je najzastupljenija hinska kiselina i to u svim ekstraktima herbi. U ekstraktima herbi vrsta roda *Urtica*, najzastupljenije jedinjenje je derivat kafene kiseline - hlorogenska kiselina (5-*O*-kafeoilhinska kis.) u koncentracijama i preko 17 mg/g. Od ostalih fenilpropanskih kiselina, prisutne su *p*-kumarinska i ferulna a naročito kafena kiselina koja zajedno sa hinskom kiselinom predstavlja prekursore u sintezi najzastupljenije hlorogenske kiseline.

Glavne razlike u kvantitativnom sastavu između ekstrakata herbi vrsta rodova *Urtica* i *Parietaria* je svakako sadržaj hlorogenske kiseline. Dok je u ekstraktima herbi vrsta roda *Urtica* ovo jedinjenje prisutno do 1,8 % u ekstraktima herbi vrsta roda *Parietaria* je prisutno do 0,04 %. Takođe je u ekstraktima herbi *Urtica* vrsta zastupljenija i kafena kiselina, dok u količini hinske kiseline nema bitnijih razlika. Što se tiče razlike u kvalitativnom sastavu: flavan-3-oli prisutni isključivo u herbama iz roda *Parietaria* a skopoletin isključivo u herbama *Urtica*.

Unutar roda *Urtica*, razdvajanje vrsta *U. dioica* i *U. kioviensis* se može izvršiti na osnovu prisustva rutina koji je u ekstraktima herbi vrste *U. dioica* prisutan sa udelom i preko 1,5 % a u *U. kioviensis* nije ni detektovan. Takođe, 3-*O*-glikozidi kemferola i kvercetin su zastupljeniji u mnogo većoj količini u ekstraktima herbi vrste *U. dioica*. Nasuprot tome, *C*-glikozid viteksin i 7-*O*-glukozid luteolina su prisutni isključivo u ekstraktima herbi vrste *U. kioviensis* u koncentraciji 1,324 mg/g, odnosno, 0,342 mg/g, kao i hiperozida u tragovima. Sama vrsta *U. kioviensis* se izdvaja od svih ovde ispitivanih po prisustvu viteksina, luteolin-7-*O*-glikozida i hiperozida a odsustvu rutina, i 3-*O*-glikozida kemferola i kvercetin u ekstraktu herbe. Između varijeteta vrste *U. dioica* postoji samo kvalitativna razlika: ekstrakti herbe varijeteta *dioica* imaju veći sadržaj hinske, kafene i hlorogenske kiseline, kao i kvercetin-3-*O*-glukozida u odnosu na varijet *pubescens*.

U okviru roda *Parietaria* jedina kvalitativna razlika jeste prisustvo katehina isključivo u ekstraktima herbi vrste *P. judaica*, a kvantitativna - količina rutina u pomenutom ekstraktu herbe koji je prisutan u koncentracijama do 1,5 % dok kod ostalih vrsta prisutan u opsegu 0,32–0,62 % (osim ekstrakta vrste *P. serbica* koji ga ima samo u tragovima). Galna kiselina je detektovana (u vrlo niskoj koncentraciji) samo u ekstraktima herbi vrsta *P. judaica* i *P. lusitanica*. Većina komponenti detektovanih u ekstraktima herbi vrsta roda *Parietaria* je prisutna u najvećoj koncentraciji u ekstraktima herbe vrste *P. judaica*, zatim *P. lusitanica*, pa *P. officinalis* i na kraju, u ekstraktu vrste *P. serbica* u kojem je određen najniži ukupan fenolni sadržaj.

Metanolni ekstrakti korena

U ekstraktima korenja (Tabela 4.10.) detektovano je, ukupno, znatno manje fenolnih komponenti u odnosu na ekstrakte herbi, naročito u ekstraktima korenja vrste *U. dioica*. Međutim, razdvajanje na nivou rodova *Urtica* i *Parietaria* je mnogo evidentnije poredeći kvalitativni sastav ekstrakata korenja. Jedino u sastavu fenolnih kiselina nema značajnije razlike. Zanimljivo je da je hlorogenska kiselina detektovana u ekstraktima korena vrsta roda *Parietaria* u znatno većem procentu (do 0,4 %) u odnosu na ekstrakte korena *Urtica* vrsta gde je ima svega 0,003 % iako bi se očekivalo suprotno zbog njene izuzetno visoke koncentracije u ekstraktima *Urtica* herbi. U ekstraktima korena vrste *U. dioica*, u višim koncentracijama je prisutna *p*-kumarinska kiselina, dok je lignanska komponenta sekoizoraricirezinol prisutna isključivo u ovim ekstraktima. Kumarin skopoletin je identifikovan isključivo u ekstraktima korena *Urtica* vrsta. Nasuprot tome, flavan-3-oli, katehin i epikatehin su prisutni isključivo u ekstraktima korena vrsta roda *Parietaria* (isto kao i kod ekstrakata herbi) i to u koncentraciji do 16 mg/g suvog ekstrakta. Takođe su i glikozidi kvercetin (3-*O*-glikozid i 3-*O*-rutinozid) i biflavonoid amentoflavon detektovani samo u ekstraktima korena vrsta iz roda *Parietaria*.

Ekstrakti korena vrsta *U. kioviensis* i *U. dioica* se razlikuju po tome što je u prvom određen veći sadržaj *p*-OH-benzoeve kiseline, niži sadržaj skopoletina i odsustvom hinske kiseline i sekoizoraricirezinola. Varieteti vrste *U. dioica* nemaju značajnije razlike u sastavu ekstrakata korenja.

Unutar roda *Parietaria* postoje razlike samo u kvantitativnom sastavu, slično kao i kod herbi. Ekstrakti korena vrste *P. judaica* imaju veći sadržaj katehina i glikozida kvercetin, a niži sadržaj epikatehina u odnosu na ostale ekstrakte korena vrsta ovog roda. Ekstrakte korena vrste *P. officinalis* karakteriše nizak sadržaj katehina ali visok sadržaj epikatehina - u ekstraktu korena *P. officinalis*2 detektovano 16,48 mg epikatehina po gramu suvog ekstrakta.

Metanolni ekstrakti lista

Kod ekstrakata lista (Tabela 4.11.) nema značajnijih kvalitativnih razlika u odnosu na odgovarajuće herbe - jedinjenja koja u listovima nisu detektovana (a u herbama jesu) su: 2,5-dihidroksibenzoeva kiselina, apigenin-7-*O*-glukozid i amentoflavon, koji su i u herbama prisutni u veoma niskom procentu. Međutim, jedinjenja koja su dominantna u ekstraktima herbi, npr. kafena, hlorogenska kiselina i rutin su u pripadajućim ekstraktima lista prisutni u značajno višoj koncentraciji.

Tabela 4.8. Jedinjenja određivana u ispitivanim ekstraktima, podjeljena po klasama.

Klasa	Broj C-atoma	Jedinjenje	Klasa	Broj C-atoma	Jedinjenje	
Fenolne kiseline	C ₆ -C ₁	<i>p</i> -OH-benzoeva k.	Flavonoidi	C ₆ -C ₃ -C ₆ flavoni	apigenin	
		2,5-dihidroksibenzoeva k.			bajkalein	
		protokatehinska k.			luteolin	
		vanilinska k.			krizoeriol	
Fenilpropenske kiseline	C ₆ -C ₃	galna k.	Izoflavoni	C ₆ -C ₃ -C ₆	flavanoni	
		siringinska k.			naringenin	
		hinska kiselina			flavonoli	kemferol
		cimetna k.			flavan-3-oli	kvercetin
		3,4-dimetoksicimetna k.			epigalokatehin galat	
Kumarini	C ₆ -C ₃	<i>p</i> -kumarinska k.	Flavonoidini glikozidi	C ₆ -C ₃ -C ₆	izoramnetin	
		<i>o</i> -kumarinska k.			miricetin	
		kafena k.			katehin	
		ferulna k.			epikatehin	
		sinapinska k.			epigalokatehin galat	
Lignani	(C ₆ -C ₃) ₂	hlorogenska k.	Biflavonoid	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	daidzein	
		matairezinol			genistein	
		sekoizolaricirezinol			viteksin (apigenin-8- <i>C</i> -glukozid)	
					apigenin-7- <i>O</i> -glukozid	
					apiin (apigenin-7- <i>O</i> -apioglukozid)	
					bajkalin (bajkalein-7- <i>O</i> -glukuronid)	
					luteolin-7- <i>O</i> -glukozid	
					kemferol-3- <i>O</i> -glukozid	
					izokvercetin (kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid)	
					kvercitrin (kvercetin-3- <i>O</i> -ramnozid)	
					hiperozid (kvercetin-3- <i>O</i> -galaktozid)	
					rutin (kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid)	
					amentoflavon	

Tabela 4.9. Rezultati kvantitativne analize fenolnih komponenti u metanolnim ekstraktima **herbi**.

Sadržaj (mg/g)	Fenolne kiseline				Fenilpropenske kiseline				Kumarini		Flavan-3-oli		C-glc	O-glikozidi						%
	p-OH-benzoeva k.	protokatehinska k.	galna k.	hinska kiselina	p-kumarinska k.	ferulna k.	kafena k.	hlorogenska k.	eskuletin	skopoletin	catehin	epikatehin	viteksin	Api-7-O-Glc	Lut-7-O-Glc	Kem-3-O-Glc	Kver-3-O-Glc	hiperozid	rutin	Σ
U.dio1 (pub)	0.018	0.031	n.d.	0.462	0.167	0.045	0.151	2.859	0.006	0.052	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.060	0.221	n.d.	1.380	0.55
U.dio3 (pub)	0.012	0.071	n.d.	0.253	0.059	0.039	0.465	11.04	0.009	0.034	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.050	0.490	n.d.	7.561	2.01
U.dio4 (pub)	0.011	0.055	n.d.	0.150	0.126	0.034	0.315	5.651	0.010	0.039	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.031	0.396	n.d.	1.429	0.83
U.dio6 (pub)	n.d.	0.062	n.d.	0.759	0.032	0.020	0.392	17.65	0.006	0.026	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.309	2.701	n.d.	15.36	3.73
U.dio8 (pub)	0.010	0.032	n.d.	0.173	0.089	0.037	0.300	8.688	0.021	0.016	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.027	0.385	n.d.	4.472	1.43
U.dio5 (dio)	0.029	0.058	n.d.	0.646	0.103	0.056	0.630	17.45	0.010	0.091	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.123	1.123	n.d.	7.314	2.76
U.dio7 (dio)	0.009	0.066	n.d.	0.645	0.055	0.021	0.692	13.82	0.007	0.013	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.080	2.051	n.d.	10.98	2.84
U.kio	det.	0.025	n.d.	2.502	0.015	0.018	0.303	13.68	0.015	det.	n.d.	0.102	1.324	n.d.	0.342	n.d.	0.084	0.074	n.d.	1.85
P.jud1	0.026	0.075	0.015	1.302	0.034	0.034	0.150	0.376	0.008	n.d.	0.593	1.429	n.d.	n.d.	n.d.	0.100	1.014	n.d.	12.80	1.80
P.jud2	0.010	0.046	0.018	2.730	0.027	0.015	0.261	0.233	0.007	n.d.	0.271	2.869	n.d.	det.	n.d.	0.188	3.264	n.d.	14.71	2.47
P.off1	0.077	0.115	n.d.	0.480	0.043	0.022	0.077	0.277	0.007	n.d.	n.d.	0.329	n.d.	n.d.	n.d.	0.031	0.283	n.d.	4.441	0.62
P.off2	0.024	0.041	n.d.	0.819	0.038	0.030	0.172	0.307	0.010	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.045	0.283	n.d.	3.738	0.55
P.off3	0.014	0.025	n.d.	0.144	0.027	0.018	0.203	det.	0.006	n.d.	n.d.	0.171	n.d.	0.012	n.d.	0.016	0.151	n.d.	3.274	0.42
P.off4	det.	0.046	n.d.	0.404	0.034	0.024	0.412	0.209	0.009	n.d.	n.d.	0.241	n.d.	n.d.	n.d.	0.037	0.301	n.d.	6.239	0.80
P.lus1	0.011	0.052	0.011	1.114	0.014	0.024	0.180	0.417	0.010	n.d.	n.d.	1.041	n.d.	n.d.	n.d.	0.058	0.629	n.d.	3.713	0.73
P.ser	0.025	0.099	n.d.	0.302	0.014	0.019	0.046	det.	0.007	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.004	n.d.	det.	0.004	n.d.	det.	0.06

■ – visoka koncentracija komponente u ekstraktu; ■ – srednja konc; ■ – niska konc; det. – detektovano ali ispod granice kvantitacije; n.d. – nije detektovano.

Tabela 4.10. Rezultati kvantitativne analize fenolnih komponenti u metanolnim ekstraktima korenja.

Sadržaj (mg/g)	Fenolne kiseline				Fenilpropenske kiseline				Kum.	Lign.	Flavan-3-oli		O-glikozidi		Biflav	%
	p-OH-benzoeva k.	protokatehinska k.	hinska kiselina	siringinska k.	p-kumarinska k.	ferulna k.	kafena k.	hlorogenska k.	skopoletin	sekoizolaricrezinol	katehin	epikatehin	Kver-3-O-Glc	rutin	amentoflavon	Σ
U.dio1 (pub)	0.018	0.008	0.143	n.d.	0.144	0.025	det.	det.	0.094	0.062	n.d.	n.d.	n.d.	det.	n.d.	0.05
U.dio3 (pub)	0.047	0.022	0.448	0.035	0.229	0.038	det.	det.	0.071	0.361	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.13
U.dio4 (pub)	0.029	0.015	0.311	n.d.	0.200	0.028	det.	det.	0.112	0.199	n.d.	n.d.	n.d.	det.	n.d.	0.10
U.dio6 (pub)	det.	0.009	0.319	n.d.	0.028	0.011	det.	det.	0.059	0.042	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.05
U.dio8 (pub)	det.	0.011	0.134	0.020	0.256	0.022	det.	det.	0.052	0.064	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.06
U.dio5 (dio)	0.048	0.011	0.359	n.d.	0.230	0.024	det.	det.	0.179	0.090	n.d.	n.d.	n.d.	det.	n.d.	0.10
U.dio7 (dio)	0.019	0.009	0.431	n.d.	0.059	0.019	n.d.	det.	0.053	0.097	n.d.	n.d.	n.d.	det.	n.d.	0.07
U.kio	0.095	0.017	n.d.	n.d.	0.091	0.025	n.d.	n.d.	0.028	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.03
P.jud1	0.048	0.046	0.419	n.d.	0.015	0.042	det.	0.483	n.d.	n.d.	0.458	4.933	0.068	0.157	0.005	0.67
P.jud2	0.034	0.072	3.509	n.d.	det.	0.013	det.	2.856	n.d.	n.d.	0.333	7.344	0.093	0.142	0.006	1.44
P.off1	0.015	0.052	0.331	0.022	0.044	0.049	0.151	4.191	n.d.	n.d.	0.077	7.667	0.013	0.059	n.d.	1.27
P.off2	0.033	0.031	0.586	n.d.	0.012	0.079	det.	4.496	n.d.	n.d.	n.d.	16.48	0.024	0.088	n.d.	2.18
P.off3	0.016	0.032	0.126	n.d.	0.039	0.019	det.	1.412	n.d.	n.d.	n.d.	1.798	0.034	0.071	n.d.	0.36
P.off4	0.041	0.091	0.146	n.d.	0.048	0.061	det.	1.049	n.d.	n.d.	0.037	3.182	0.045	0.109	n.d.	0.48
P.lus1	0.021	0.035	0.890	n.d.	n.d.	0.050	det.	3.291	n.d.	n.d.	0.158	14.51	0.044	0.137	n.d.	1.91

■ – visoka koncentracija komponente u ekstraktu; ■ – srednja konc; ■ – niska konc;
det. – detektovano ali ispod granice kvantitacije; n.d. – nije detektovano.

Tabela 4.11. Rezultati kvantitativne analize fenolnih komponenti u metanolnim ekstraktima **lista**.

Sadržaj (mg/g)	Fenolne kiseline				Fenilpropenske kiseline				Kumarini		Flavan-3-oli		C-glc	O-glikozidi					%
	p-OH-benzoeva k.	protokatehinska k.	galna k.	hinska kiselina	p-kumarinska k.	ferulna k.	kafena k.	hlorogenska k.	eskuletin	skopoletin	katehin	epikatehin	viteksin	Lut-7-O-Glc	Kem-3-O-Glc	Kver-3-O-Glc	hiperozid	rutin	
U.dio1 (pub)	0.019	0.071	n.d.	1.313	0.010	0.022	0.295	6.700	0.006	0.035	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.019	0.151	n.d.	1.206	0.99
U.dio4 (pub)	0.021	0.165	n.d.	0.360	n.d.	0.013	0.289	2.662	0.012	0.021	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.000	0.002	n.d.	1.021	0.46
U.dio6 (pub)	0.013	0.058	n.d.	0.971	n.d.	0.031	0.668	22.19	0.005	0.016	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.389	n.d.	n.d.	11.62	3.60
U.dio5 (dio)	0.015	0.072	n.d.	0.655	0.026	0.052	0.928	28.11	0.007	0.073	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.070	1.075	n.d.	4.622	3.57
U.dio7 (dio)	det.	0.079	n.d.	0.566	0.020	0.021	0.732	9.752	0.004	0.026	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.016	0.249	n.d.	2.446	1.39
U.kio	det.	0.025	n.d.	0.825	0.011	0.012	0.339	20.96	0.014	n.d.	n.d.	0.079	1.386	0.386	n.d.	0.086	0.067	n.d.	2.42
P.jud1	0.019	0.074	0.017	1.353	0.028	0.023	0.281	0.830	0.011	n.d.	0.230	0.730	n.d.	n.d.	0.094	0.783	n.d.	22.75	2.72
P.jud2	det.	0.053	0.017	5.880	0.022	0.010	0.534	0.206	0.007	n.d.	0.065	0.619	n.d.	n.d.	0.104	1.141	n.d.	8.813	1.75
P.off1	0.019	0.189	n.d.	0.474	det.	0.032	0.281	0.491	0.012	n.d.	n.d.	0.236	n.d.	n.d.	0.027	0.269	n.d.	7.800	0.98
P.off2	0.018	0.026	n.d.	0.349	det.	n.d.	0.276	0.240	0.010	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.061	0.20
P.off3	n.d.	0.041	n.d.	0.438	0.024	0.039	0.624	0.431	0.006	n.d.	n.d.	0.855	n.d.	n.d.	0.054	0.475	n.d.	12.48	1.55
P.off4	0.010	0.071	n.d.	0.692	0.017	0.038	0.625	0.278	0.016	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.008	0.056	n.d.	1.666	0.35
P.lus1	n.d.	0.055	n.d.	2.041	det.	n.d.	0.332	0.764	0.006	n.d.	n.d.	0.692	n.d.	n.d.	0.026	0.308	n.d.	3.821	0.81

■ – visoka koncentracija komponente u ekstraktu; ■ – srednja konc; ■ – niska konc;
 det. – detektovano ali ispod granice kvantitacije; n.d. – nije detektovano.

Tabela 4.12. Rezultati kvantitativne analize fenolnih komponenti u metanolnim ekstraktima cveta.

Sadržaj (mg/g)	Fenolne kiseline				Fenilpropenske kiseline				Kumarini		Flavanon	Flavan-3-oli		O-glikozidi			%
	p-OH-benzoeva k.	protokatehinska k.	galna k.	hinska kiselina	p-kumarinska k.	ferulina k.	kafena k.	hlorogenska k.	eskuletin	skopoletin	naringenin	katehin	epikatehin	Kem-3-O-Glc	Kver-3-O-Glc	rutin	Σ
U.dio1 (pub)	0.014	0.032	0.009	0.434	det.	0.058	0.275	9.645	0.006	0.021	n.d.	0.025	n.d.	1.029	1.699	0.889	1.41
U.dio4 (pub)	0.017	0.032	n.d.	0.268	0.011	0.091	0.414	15.76	0.008	0.018	n.d.	0.076	n.d.	0.705	2.636	4.638	2.47
U.dio6 (pub)	0.011	0.063	0.027	2.913	0.010	0.022	0.272	57.75	0.010	0.026	n.d.	0.511	n.d.	0.220	2.703	30.49	9.50
U.dio8 (pub)	0.061	0.093	n.d.	0.411	0.032	0.034	0.132	6.206	0.064	0.025	n.d.	0.241	n.d.	0.226	0.203	1.992	0.97
U.dio5 (dio)	0.036	0.023	n.d.	0.864	0.021	0.050	0.645	35.44	0.009	0.040	n.d.	1.017	n.d.	0.603	2.821	9.474	5.10
U.dio7 (dio)	det.	0.041	0.016	1.277	det.	0.041	0.449	17.08	0.003	0.007	n.d.	0.046	n.d.	0.427	3.886	9.119	3.24
P.jud1	0.192	0.417	0.020	1.531	0.065	0.019	0.048	0.260	0.017	n.d.	det.	0.612	0.492	0.080	0.385	3.895	0.80
P.jud2	0.018	0.125	0.052	n.d.	0.030	n.d.	0.142	0.362	0.007	n.d.	det.	0.590	4.350	0.122	2.356	10.25	1.84
P.off1	0.080	0.141	n.d.	1.605	0.019	0.016	0.037	0.572	0.009	n.d.	0.022	0.070	5.028	0.217	1.217	5.565	1.46
P.off2	0.072	0.068	0.010	1.680	0.012	0.014	det.	1.045	0.013	n.d.	0.022	n.d.	1.535	0.340	1.052	3.792	0.97
P.off3	0.019	0.017	n.d.	1.077	0.022	0.022	0.212	0.584	det.	n.d.	det.	n.d.	0.892	0.089	0.797	2.858	0.66
P.off4	0.061	0.081	n.d.	1.092	0.021	0.044	0.133	1.813	0.008	n.d.	det.	n.d.	0.878	0.084	0.679	3.617	0.85
P.lus1	0.057	0.111	n.d.	1.545	0.007	0.019	0.038	0.384	0.007	n.d.	n.d.	n.d.	0.269	0.067	0.454	1.510	0.45

■ – visoka koncentracija komponente u ekstraktu; ■ – srednja konc; ■ – niska konc;
 det. – detektovano ali ispod granice kvantitacije; n.d. – nije detektovano.

Tabela 4.13. Rezultati kvantitativne analize fenolnih komponenti u metanolnim ekstraktima **stabljika**.

Sadržaj (mg/g)	Fenolne kiseline			Fenilpropenske kiseline				Kum.	Flavan-3-oli		O-glikozidi			%
	p-OH-benzoeva k.	protokatehinska k.	hinska kiselina	p-kumarinska k.	ferulna k.	kafena k.	hlorogenska k.	skopoletin	katehin	epikatehin	Kem-3-O-Glc	Kver-3-O-Glc	rutin	Σ
U.dio1 (pub)	0.015	0.011	0.055	0.294	0.059	det.	0.983	0.072	n.d.	n.d.	n.d.	0.051	1.238	0.28
U.dio4 (pub)	0.023	0.014	0.039	0.376	0.061	0.033	1.874	0.054	n.d.	n.d.	0.007	0.383	1.352	0.42
U.dio6 (pub)	0.013	0.024	0.221	0.078	0.023	det.	2.222	0.094	n.d.	n.d.	0.022	0.536	10.62	1.39
U.dio8 (pub)	det.	0.028	n.d.	0.139	0.026	det.	2.227	0.013	n.d.	n.d.	n.d.	0.142	2.585	0.52
U.dio5 (dio)	0.014	0.007	0.088	0.179	0.024	0.031	2.303	0.048	n.d.	n.d.	0.017	0.481	2.253	0.54
U.dio7 (dio)	0.012	0.016	0.159	0.384	0.024	det.	0.800	0.048	n.d.	n.d.	n.d.	0.111	2.245	0.38
P.jud1	0.013	0.028	0.627	0.055	0.041	det.	0.370	n.d.	1.316	2.105	0.114	1.372	6.746	1.28
P.jud2	0.031	0.107	3.934	0.013	0.013	0.022	0.229	n.d.	0.360	3.607	0.524	7.711	10.80	2.73
P.off1	det.	0.008	0.076	0.125	0.034	n.d.	0.060	n.d.	n.d.	0.032	0.005	0.051	0.395	0.08
P.off2	det.	0.015	0.113	0.089	0.037	n.d.	0.032	n.d.	n.d.	n.d.	0.006	0.058	0.334	0.07
P.off3	det.	0.008	0.052	0.021	0.024	n.d.	0.036	n.d.	n.d.	0.122	0.008	0.070	0.523	0.09
P.off4	0.015	0.024	0.048	0.047	0.038	n.d.	0.052	n.d.	n.d.	n.d.	0.009	0.078	0.339	0.07
P.lus1	det.	0.045	0.398	det.	0.024	n.d.	0.101	n.d.	n.d.	0.778	0.039	0.670	2.134	0.42

■ – visoka koncentracija komponente u ekstraktu; ■ – srednja konc; ■ – niska konc;
 det. – detektovano ali ispod granice kvantitacije; n.d. – nije detektovano.

Tabela 4.14. Rezultati kvantitativne analize fenolnih komponenti u vodenim ekstraktima (infuzima) **herbi, lista i korena**.

Sadržaj (mg/g)	Fenolne kiseline		Fenilpropenske kiseline		Kum.	Lign.	Flavan-3-oli		O-glikozidi				%	
	protokatehinska k.	hinska kiselina	p-kumarinska k.	htorogenska k.			katehin	epikatehin	Lut-7-O-Glc	Kem-3-O-Glc	Kver-3-O-Glc	rutin		
HERBA	U.dio1 (pub)	0.016	1.019	0.022	0.108	0.004	n.d.	n.d.	n.d.	0.021	0.009	n.d.	0.022	0.12
	U.dio6 (pub)	0.035	1.624	0.010	0.147	0.007	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.005	0.012	0.18
	P.jud1	0.062	2.255	0.012	0.093	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.003	0.025	0.144	0.26
	P.jud2	0.032	3.646	0.012	0.014	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.004	0.005	0.021	0.054	0.38
	P.off2	0.017	1.202	0.011	0.032	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.002	0.006	0.013	0.108	0.14
	P.off3	0.012	0.432	0.011	0.008	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.003	n.d.	n.d.	0.004	0.05
LIST	U.dio1 (pub)	0.019	2.306	0.005	0.057	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.014	n.d.	0.037	0.009	0.24
	P.jud1	0.050	1.949	0.014	0.014	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.006	0.038	0.21
	P.off2	0.006	1.017	0.004	0.003	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.003	0.003	0.10
	P.off3	0.016	0.863	0.017	0.004	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.000	0.002	0.09
KOREN	U.dio1 (pub)	0.008	0.105	0.032	0.038	0.017	0.048	n.d.	n.d.	0.017	0.005	0.044	0.013	0.03
	P.jud1	0.065	0.453	n.d.	0.095	n.d.	n.d.	0.063	0.331	n.d.	0.002	0.017	0.015	0.10

■ – visoka koncentracija komponente u ekstraktu; ■ – srednja konc; ■ – niska konc;
det. – detektovano ali ispod granice kvantitacije; n.d. – nije detektovano.

Metanolni ekstrakti cveta

Slična situacija je i kada se porede ekstrakti cveta i herbi, komponente koje su u herbama bile prisutne u tragovima (2,5-dihidroksibenzoeva kiselina, apigenin-7-*O*-glukozid i amnetoflavon) nisu detektovani u ekstraktima cveta (Tabela 4.12.). Međutim, jedini detektovani aglikon – naringenin – je detektovan upravo u ekstraktima sveta vrsta roda *Parietaria*. Bitno je napomenuti da se u ekstraktima cveta vrste *U. dioica* javlja katehin i to u koncentraciji do 1,02 mg/g dok u ekstraktima pripremljenih iz ostalih delova ove biljke nije ni detektovan. Isti slučaj kao i kod ekstrakata lista, komponente dominantne u herbama su u ekstraktima cveta prisutne u mnogo većem procentu, npr. ekstrakt cveta *U. dioica*6 sadrži 5,8 % hlorogenske kiseline odnosno 3,0 % rutina.

Metanolni ekstrakti stabljike

Kao što je i očekivano, u ekstraktima stabljika (Tabela 4.13.) detektovano je najmanje fenolnih jedinjenja u odnosu na ostale delove biljke. Ekstrakti stabljike vrste *U. dioica* imaju veći sadržaj *p*-kumarinske kiseline u odnosu na odgovarajuće ekstrakte herbe, ali je sadržaj hlorogenske kiseline znatno niži u odnosu na ekstrakte herbi, lista i cveta, kod svih vrsta. U ovim rezultatima, izdvajaju se ekstrakti stabljike vrste *P. judaica* sa izuzetno visokim sadržajem hinske kiseline, katehina, epikatehina i 3-*O*-glikozida kemferola i kvercetina, znatno višim u odnosu na odgovarajuće herbe. Ovo može značiti da je u momentu skupljanja biljnog materijala, bio intenzivan transport kroz pomenute stabljike ili da je kod ovih biljaka sama stineza određenih biljnih fenola omogućena u stabljikama.

Vodeni ekstrakti – infuzi

U vodenim ekstraktima ili infuzima detektovan je znatno manji broj fenolnih komponenti u odnosu na metanolne ekstrakte zbog veće polarnosti ekstragensa (Tabela 4.14.). U infuzima herbi detektovano je ukupno 9 jedinjenja a u infuzima lista svega 7. U infuzima korena detektovano je 12 jedinjenja ali u nižim koncentracijama u odnosu na infuze herbe i lista. U svim infuzima (bez obzira na vrstu ili biljni organ) dominantna komponenta je hinska kiselina kao veoma polarno jedinjenje. U infuzima vrsta roda *Urtica* nađen je viši sadržaj hlorogenske kiseline nego kod ostalih vrstama a kumarin skopoletin je detektovan jedino u tim infuzima. Slično metanolnim ekstraktima, i u ovom slučaju, jedini lignan, sekoizolaricirezinol, identifikovani je u infuzu korena vrste *U. dioica*, dok su flavan-3,4-dioli nađeni isključivo u infuzu korena vrste *P. judaica*. Ukupan sadržaj detektovanih fenolnih komponenti u infuzima herbi se kretao u opsegu 0,05 - 0,38 % SE, sa najvišim sadržajem u herbama vrste *P. judaica*. Infuzi lista imaju slučan sadržaj fenolnih komponenti (0,09 - 0,24 %) dok je u infuzima korena određeno svega 0,03 % kod vrste *U. dioica* i 0,10 % kod vrste *P. judaica*. Na osnovu određenog kvantitativnog sastava fenolnih komponenti u infuzima nije bilo moguće izdvojiti konkretne razlike na nivou rodova i vrsta i okarakterisati ih kao taksonomske markere.

4.1.3.1. Marker na nivou rodova i vrsta

Rezultati kvantitativne LC/MS-MS metode metanolnih ekstrakata ukazuju da su biljni organi sa najvećim sadržajem biljnih fenola upravo cvetovi gde samo ispitivana jedinjenja čine već 0,45 - 9,50 % suvog ostatka. Slede herbe (0,55 - 3,73 %), zatim listovi (0,35 - 3,60 %) i na kraju stabljike (0,07 - 2,73 % - izuzetak stabljike vrste *P. judaica*) i korenje (0,03 - 2,18 %). U vodenim ekstraktima ili infuzima određen je znatno niži sadržaj fenolnih komponenti (u opsegu 0,03 - 0,38 %) u odnosu na metanolne ekstrakte. Stoga, kvantitativnom analizom infuza nije bilo moguće izdvojiti konkretna jedinjenja kao potencijalne taksonomske markere. Suprotno tome, poređenjem kvalitativnog (i kvantitativnog) sastava metanolnih ekstrakata, izdvajaju se sledeća jedinjenja koja predstavljaju potencijalne taksonomske markere na novou rodova i vrsta:

- hlorogenska kiselina predstavlja dominantnu komponentu ekstrakata herbi, lista i cveta vrsta roda *Urtica* (do 5,8 % u cvetu, 2,8 % u listu i 1,8 % u herbi) dok je u ekstraktima istih delova vrsta roda

Parietaria ima znatno manje. Obrnut je slučaj kod ekstrakata korenja dok u ekstraktima korena vrsta roda *Urtica* nije ni detektovana, u slučaju roda *Parietaria* je prisutna u znatno višoj koncentraciji u odnosu na odgovarajuće herbe, tako da ovo jedinjenje može poslužiti pri taksonomskom razdvajanju ova dva roda.

- kafeine kiseline ima mnogo više u ekstraktima lista, cveta i stabljike *Urtica* vrsta u odnosu na ekstrakte istih biljnih organa *Parietaria* vrsta, dok kod ekstrakata herbi razlika nije izražena.

- katehin se može označiti i kao mogući taksonomski marker za vrstu *Parietaria judaica* pošto je među svim ekstraktima herbi, lista i stabljika nađen jedino u ekstraktima pomenutih organa ove vrste. Prisutan je, ali u znatno nižem procentu, u ekstraktima korena vrste *P. lusitanica* i cveta vrste *U. dioica*.

- epikatehin je najzastupljeniji u ekstraktima korena vrsta roda *Parietaria* (npr. *P. officinalis* 2 - 1,6 %, *P. lusitanica* - 1,4 %) i ujedno predstavlja njihovu dominantnu komponentu. U ekstraktima korena *Urtica* vrsta nije detektovan, tako da je ovo, zajedno sa katehinom, potencijalni taksonomski marker po kome se izdvaja rod *Parietaria*. Ovo jedinjenje je prisutno i u ekstraktima ostalih organa *Parietaria* vrsta (ali u nižim koncentracijama), i iako nije detektovan ni u jednom ekstraktu vrste *U. dioica*, u ekstraktima herbe i lista vrste *U. kioviensis* je detektovan ali u niskim koncentracijama. Stoga, epikatehin se može okarakterisati kao taksonomski marker pri razdvajanju ova dva roda, samo po njegovom sadržaju u ekstraktima korena ili cveta.

- rutin je dominantno jedinjenje svih ekstrakata herbi vrsta roda *Parietaria* (osim *P. serbica*). Najveći sadržaj rutina imaju ekstrakti herbe vrste *P. judaica* (1,5 i 1,3 %) dok se kod ekstrakata herbi ostalih vrsta kreće u opsegu 0,32 - 0,62 %. U ekstraktima herbi vrste *U. dioica* je rutin drugo dominantno jedinjenje (posle hlorogenske kisleine) ali su primećene velike razlike u sadržaju rutina u ekstraktima herbi sa različitih lokaliteta pa se njegov sadržaj kreće u opsegu od 0,13 % kod *U. dio1* (pub) do 1,5 % kod *U. dio6* (pub). Interesantno je da je sadržaj rutina u ekstraktima herbi vrsta roda *Urtica* uvek proporcionalan ukupnom sadržaju fenola. Potencijalni taksonomski marker za vrstu *U. kioviensis* jeste potpuno odsustvo rutina u ekstraktima svih organa ove vrste. Kako rutin u ekstraktima herbi ostalih vrsta predstavlja dominantnu komponentu, a potpuno je odsutan u vrsti *U. kioviensis*, određivanjem samo ovog jedinjenja je moguće razdvojiti ovu vrstu od ostalih ispitivanih. Što se tiče ekstrakata korenja, rutin je prisutan u koncentraciji iznad granice kvantitacije samo u ekstraktima korena vrsta roda *Parietaria* ali znatno manje u odnosu na herbe. U ekstraktima ostalih organa (list, cvet i stabljika) vrsta roda *Parietaria*, rutin takođe (kao kod herbi) predstavlja dominantnu, a kod ekstrakata istih organa vrste *U. dioica* sekundarnu dominantnu komponentu.

- kemferol-3-*O*-glukozid slično kao i rutin može predstavljati negativni marker za vrstu *U. kioviensis* pošto ovaj glikozid nije detektovan u ekstraktima herbi i lista pomenute vrste dok kod preostalih ispitivanih jeste, mada u niskim koncentracijama.

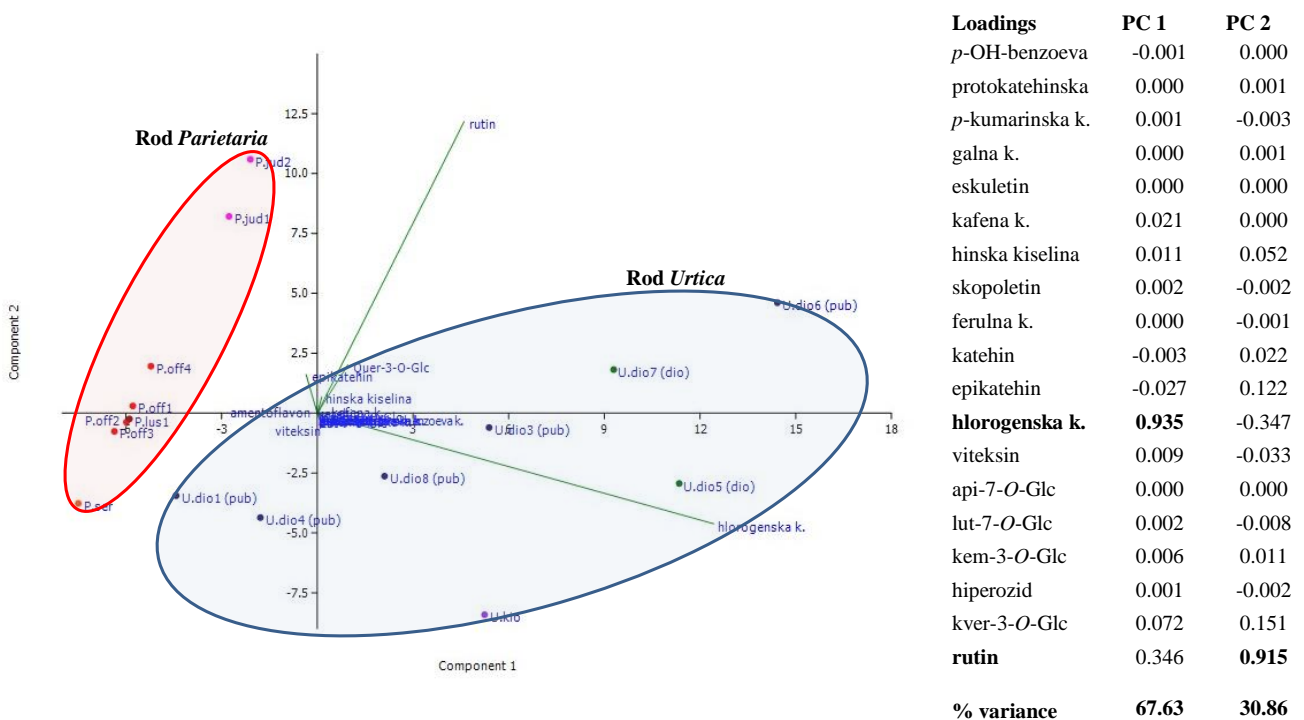
- kvercetin-3-*O*-glukozid je prisutan u ekstraktima herbi vrsta *U. kioviensis* i *P. serbica* u znatno nižoj koncentraciji u odnosu na ekstrakte herbi svih ostalih ispitivanih vrsta. U ekstraktima korena javlja se kod isključivo kod *Parietaria* vrsta. Interesantno je da je ovaj glikozid prisutan u veoma visokom sadržaju (0,8 %) u ekstraktu stabljike vrste *P. judaica*, što je neočekivano s obzirom da je u ovom biljnom organu sadržaj fenola obično nizak.

- viteksin, luteolin-7-*O*-glukozid i, u manjoj meri, hiperozid mogu predstavljati taksonomske markere za vrstu *U. kioviensis* s obzirom da su ova tri glikozida detektovana isključivo u ekstraktima herbi i lista pomenute vrste.

- galna kiselina je detektovana samo u ekstraktima herbi vrsta *P. judaica* i *P. lusitanica*, kao i ekstraktu lista vrste *P. judaica* ali u koncentracijama veoma bliskim granicama kvantitacije, stoga mogu služiti kao dodanta informacija pri razdvajanju ispitivanih vrsta a nikako kao taksonomski marker.

- *p*-kumarinska kiselina je prisutna u svim ispitivanim uzorcima. Međutim, u proseku je viši sadržaj ovog jedinjenja detektovan u ekstraktima herbi, korena i stabljika vrste *U. dioica* u odnosu na odgovarajuće organe ostalih ispitivanih vrsta.
- skopoletin predstavlja potencijalni taksonomski marker vrste *U. dioica* pošto je prisutan u ekstraktima svih organa pomenute vrste dok kod ekstrakata vrsta roda *Parietaria* nije. U ekstraktima herbe i korena vrste *U. kioviensis* je detektovan ali u znatno nižem sadržaju (herba - det. koren - 0,003 %) u odnosu na *U. dioica*-u (herbe - do 0,009; korenje - do 0,020 %).
- sekoizolaricirezinol je detektovan isključivo u ekstraktima korena vrste *U. dioica* (u opsegu 0,062 - 0,361 mg/g SE) i stoga predstavlja potencijalni taksonomski marker ove vrste (u odnosu na ostale vrste ispitivane u ovom radu).
- amentoflavon, jedini određivan biflavonoid, je detektovan isključivo u ekstraktima korena vrste *P. judaica* ali u prilično niskim koncentracijama (0,005 - 0,006 mg/g SE) pa bi bio nepouzdan kao taksonomski marker za ovu vrstu.
- naringenin, jedini detektovani flavanon, je prisutan isključivo u ekstraktima cveta vrsta *P. judaica* i *P. officinalis* ali u koncentracijama $\leq 0,022$ mg/g SE, pa je kao i amentoflavon, nepouzdan za razdvajanje ovih vrsta od ostalih ispitivanih.

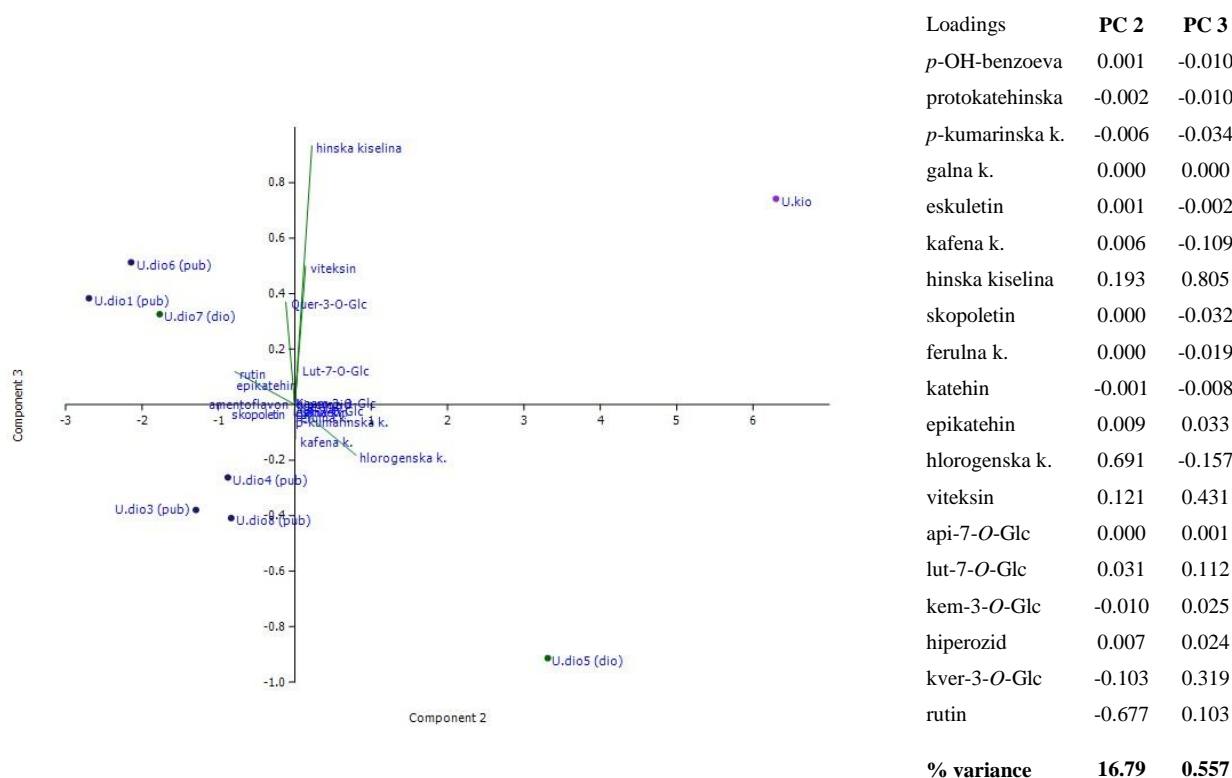
Primenom analize glavnih komponenti (PCA – *principal component analysis*) na rezultate dobijene kvantitativnom analizom odabranih fenolnih jedinjenja, možemo uočiti koja su jedinjenja (od ispitivanih) najznačajnija pri razdvajanju vrsta iz rodova *Urtica* i *Parietaria*, kao i pojedinačnih vrsta u okviru ova dva roda na osnovu varijabilnosti sadržaja pojedinih komponenti (Prilog 8.4.1., Tabele 8.11. – 8.14.). Analizom glavnih komponenti prisutnih u ekstraktima herbi dobijamo biplot (Slika 4.22.) na kome sa jasno grupišu vrste roda *Urtica* (plava boja) i *Parietaria* (crveno). Kao što je i ranije navedeno, a može se uočiti i sa grafika, hlorogenska kiselina je dominantna u ekstraktima herbi *Urtica* vrsta, i predstavlja glavnu razliku u odnosu na rod *Parietaria*. Viski sadržaj rutina je prisutan u ekstraktima herbi vrsta iz oba roda ali je u nešto višem sadržaju detektovan kod vrste *P. judaica*, koja se po PC2 (na kojoj rutin ima veliko pozitivno opterećenje) odvađa od ostalih *Parietaria* vrsta.



Slika 4.22. PCA fenolnih jedinjenja nađenih u ekstraktima herbi svih ispitivanih vrsta.

Viši sadržaj kvercetin-3-*O*-glukozida i hinske kiseline u ekstraktima herbi je karakterističan za rod *Urtica* a epikatehina i katehina za rod *Parietaria*.

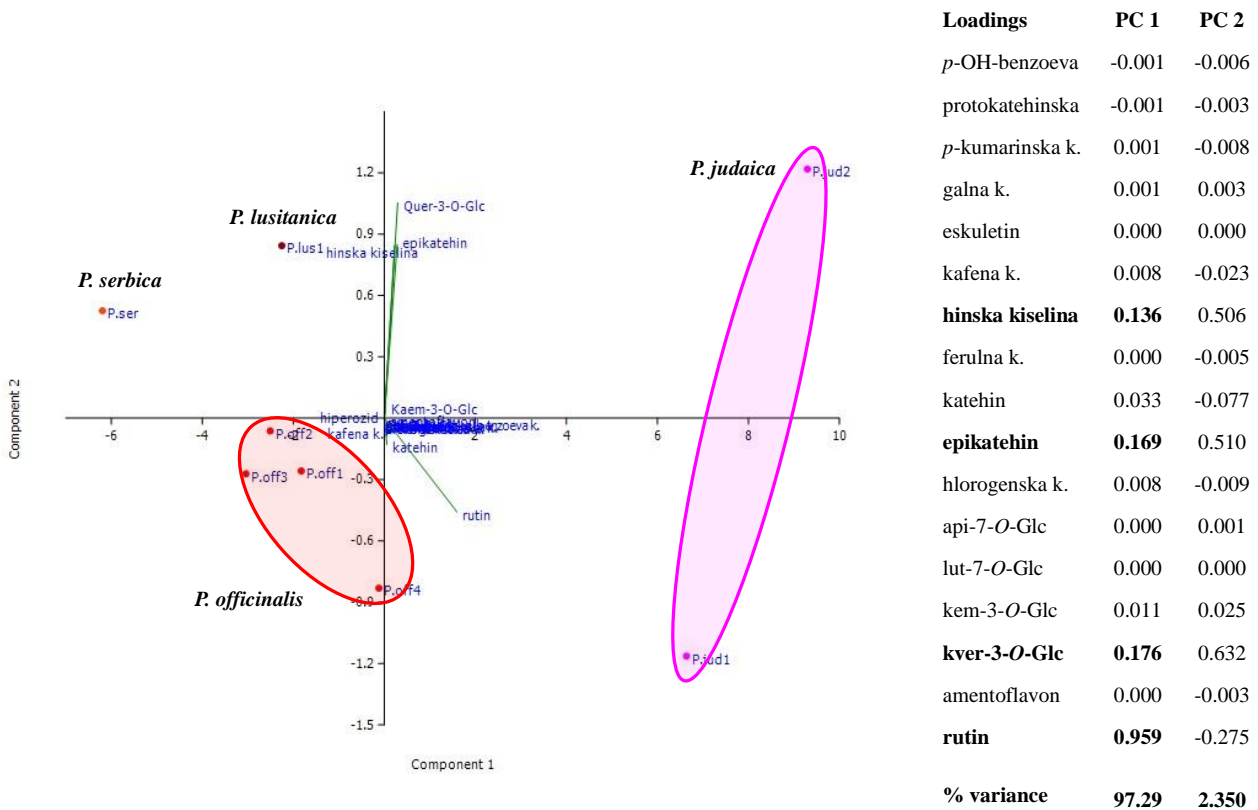
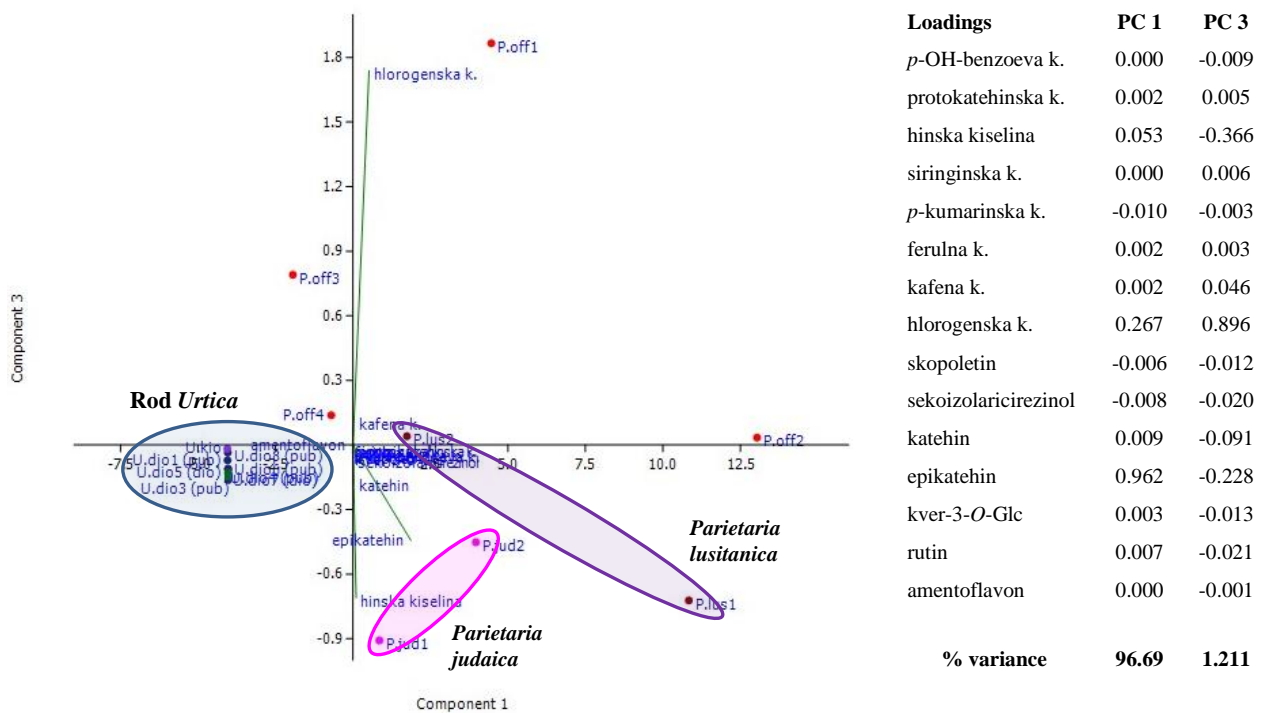
U cilju markiranja komponenti ekstrakata herbi po kojima se mogu razdvojiti dve ispitivane vrste roda *Urtica*, konstruisan je biplot (Slika 4.23.) sa koga se može zaključiti da je vrsta *U. kioviensis* odvojena od vrste *U. dioica* ali da ni jedno pojedinačno jedinjenje nema visoko opterećenje u smeru *U. kioviensis*. Glavna razlika između ove dve vrste je prisustvo viteksina i luteolin-7-*O*-glukozida (i hiperozida u manjoj meri) u ekstraktu herbi vrste *U. kioviensis* a rutina isključivo kod vrste *U. dioica*. Hinska kiselina je prisutna u ekstraktima herbi obe vrste, mada u većem sadržaju kod *U. kioviensis*.



Slika 4.23. PCA fenolnih jedinjenja nađenih u ekstraktima herbi vrsta roda *Urtica*

Kod ekstrakata vrsta roda *Parietaria*, izdvaja se vrsta *P. judaica* čiji ekstrakti herbi imaju visok sadržaj rutina, kvercetin-3-*O*-glukozida, epikatehina i hinske kiseline. Ekstrakti herbi vrste *P. lusitanica* prate prethodne po sadržaju poslednje tri komponente ali sadrže znatno manje rutina, dok u ekstraktima herbi vrste *P. officinalis* ima nizak sadržaj sva četiri ključna jedinjenja pa su sve herbe grupisane u donjem levom kvadrantu (Slika 4.24.).

Ranije je napomenuto da ekstrakte korena vrsta roda *Urtica* karakteriše izuzetno nizak sadržaj fenolnih jedinjenja, što je potvrđeno i konstruisanjem biplota (Slika 4.25.) jer su ovi ekstrakti grupisani u donjem levom kvadrantu. Jedina komponenta karakteristična samo za ove ekstrakte jeste lignan sekoizolaricirezinol. Prema skorovima za ovu komponentu, na PC1 i PC3, od -0,008 i -0,020, respektivno, evidentno je da je njegov položaj na grafiku u donjem levom kvadrantu zajedno sa ekstraktima korena *Urtica* vrsta. Hinske, hlorogenske kiseline i epikatehina ima znatno više u ekstraktima korena vrste *P. officinalis* sa prvog i drugog lokaliteta u odnosu na treći i četvrti pa nije postignuto grupisanje uzoraka ove vrste tako dobro kao ostalih. Ekstrakti korena vrsta *P. judaica* se izdvajaju po visokom sadržaju hinske kiseline, epikatehina i naročito katehina.

Slika 4.24. PCA fenolnih jedinjenja nađenih u ekstraktima herbi vrsta roda *Parietaria*

Slika 4.25. PCA fenolnih jedinjenja nađenih u ekstraktima korena svih ispitivanih vrsta.

4.1.3.2. Distribucija kvantifikovanih fenolnih komponenti po biljnim organima

Poseban osvrt na rezultate dobijene kvalitativnom LC/MS-MS analizom je urađen u cilju pregleda distribucije fenolnih jedinjenja po biljnim organima. Rezultati predstavljeni u *Tabeli 4.15.* su na primeru dva odabrana reprezentativna uzorka: metanolih ekstrakata vrsta *U.dio6* (pub) i *P.judaica2* koji (u manjoj ili većoj meri) prate raspodelu određivanih jedinjenja i u ostalim uzorcima (svaki za svoj rod).

Kod vrste *U. dioica* primećuje se da je ekstrakt korena najsiromašniji određivanim fenolnim jedinjenjima sa svega 0,05 % SE a najbogatiji ekstrakt cveta sa 9,5 % SE. Od C₆-C₁ kiselina u ekstraktu korena prisutna je samo hinska kiselina (protokatehinska u tragovima) dok fenilpropanskih kiselina ima znatno manje, a *O*-glikozidi flavonoida su potpuno odsutni. Jedinjenje koje je prisutno isključivo u korenu jeste lignan sekoizolaricirezinol. Lignani, pored ostalog, mogu da stite koren od gljivičnih infekcija te je očekivano da će ove komponente biti lokalizovane u korenu biljke. Između ekstrakata herbe i lista nema značajnijih kvalitativnih ni kvantitativnih razlika dok je u cvetu akumulirano najviše fenolnih komponenti među kojima dominiraju hlorogenska kiselina i rutin sa po 57,8 i 30,5 mg/g SE. Dodatno, samo u ekstraktu cveta je detektovan jedini aglikon katehin. Kvalitativni sastav ekstrakta stabljike nije bitno drugačiji od ekstrakata herbi i lista ali je količina određenih fenola u njoj znatno niža u odnosu na druga dva organa.

U slučaju vrste *P. judaica* takođe je ekstrakt korena sa najnižim sadržajem određivanih fenola sa 1,4 % SE, međutim to je znatno viši sadržaj u odnosu na ekstrakte korena vrste *U. dioica*. Ono što je ovde veoma interesantno a to je da je najveći sadržaj određivanih fenolnih jedinjenja određen upravo u ekstraktu stabljike što nije očekivano. U ovom ekstraktu određen je visok sadržaj 3-*O*-glukozida kemferola i kvercetina, dok po sadržaju rutina parira cvetovima i herbi. U ekstraktima korenja dominantna jedinjenja su epikatehin, hinska i hlorogenska kiselina, takođe neočekivano s obzirom da su ova jedinjenja karakteristična za nadzemne delove biljaka. Jedini detektovani flavanon je u ekstraktu cveta, mada u vrlo niskoj koncentraciji, i sam ekstrakt cveta ima znatno niži sadržaj određivanih fenola poređeno sa ekstraktima *Urtica* vrsta.

4.1.4. Sumiranje kvalitativne i kvantitativne LC-DAD-MS analize

U ovom poglavlju biće dat pregled hemijskog sastava svakog ispitivanog ekstrakta, sumiranjem rezultata iz prethodna dva poglavlja (kvalitativne i kvantitativne LC-MS/MS analize) uz osvrt na do sada objavljene literaturne podatke o hemijskom sastavu ispitivanih biljnih vrsta. Koncentracija ekstrakata za scan analizu je bila 50 mg/mL (originalni ekstrakti razblaženi u mobilnoj fazi). Za svaki ispitivani ekstrakt dati su BPC hromatogrami (iz kojih su isključeni joni artefakata) dobijeni snimanjem u pozitivnom i negativnom modu, na kojima su označene, radi preglednosti, samo identifikovane komponente. Za svaki integrisani pik u scan hromatogramima, najpre je ekstrahovan MS¹ spektar korigovan za vrednost spektra neposredne okoline, u negativnom i pozitivnom modu. Na osnovu tih spektara određena je molekulska masa datog jedinjenja. Za dodatnu potvrdu strukture jedinjenja, za svaki integrisani pik iz scan hromatograma snimljeni su MS² spektri (u oba moda, pri četiri kolizione energije) i ti rezultati su tabelarno prikazani u *Prilogu 8.3.*, *Tabela 8.3.*, dok su slike pojedinačnih spektara (za svaki od 164 pika: MS¹, UV i MS² spektri) date u *Dodatnom materijalu* na CD-u.

Tabela 4.15. Dva reprezentativna primera distribucije kvantifikovanih biljnih fenola po biljnim organima (metanolni ekstrakti).

	Biljni organ	Fenolne kiseline				Fenilpropenske kiseline				Kumarini		Lign.	Flavanon	Flavan-3-oli		O-glikozidi			%
		p-OH-benzoeva k.	protokatehinska k.	galna k.	hinska kiselina	p-kumarinska k.	ferulna k.	kafena k.	hlorogenska k.	eskuletin	skopoletin	sekoizolaricrezinol	naringenin	katehin	epikatehin	Kem-3-O-Glc	Kver-3-O-Glc	rutin	Σ
U.dioica6 (pubescens)	herba	n.d.	0.062	n.d.	0.759	0.032	0.020	0.392	17.65	0.006	0.026	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.309	2.701	15.36	3.73
	list	0.013	0.058	0.015	0.971	n.d.	0.031	0.668	22.19	0.005	0.016	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.389	1.075	11.62	3.60
	cvet	0.011	0.063	0.027	2.913	0.010	0.022	0.272	57.75	0.010	0.026	n.d.	n.d.	0.511	n.d.	0.220	2.703	30.49	9.50
	stabljika	0.013	0.024	n.d.	0.221	0.078	0.023	det.	2.222	n.d.	0.094	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.022	0.536	10.62	1.39
	koren	det.	0.009	n.d.	0.319	0.028	0.011	det.	det.	n.d.	0.059	0.042	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P.judaica2	herba	0.010	0.046	0.018	2.730	0.027	0.015	0.261	0.233	0.007	n.d.	n.d.	n.d.	0.271	2.869	0.188	3.264	14.71	2.46
	list	n.d.	0.053	0.017	5.880	0.022	0.010	0.534	0.206	0.007	n.d.	n.d.	n.d.	0.065	0.619	0.104	1.141	8.813	1.75
	cvet	0.018	0.125	0.052	1.531	0.030	n.d.	0.142	0.362	0.007	n.d.	n.d.	0.008	0.590	4.350	0.122	2.356	10.25	1.99
	stabljika	0.031	0.107	n.d.	3.934	0.013	0.013	0.022	0.229	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.360	3.607	0.524	7.711	10.80	2.73
	koren	0.034	0.072	n.d.	3.509	det.	0.013	det.	2.856	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.333	7.344	n.d.	0.093	0.142	1.44

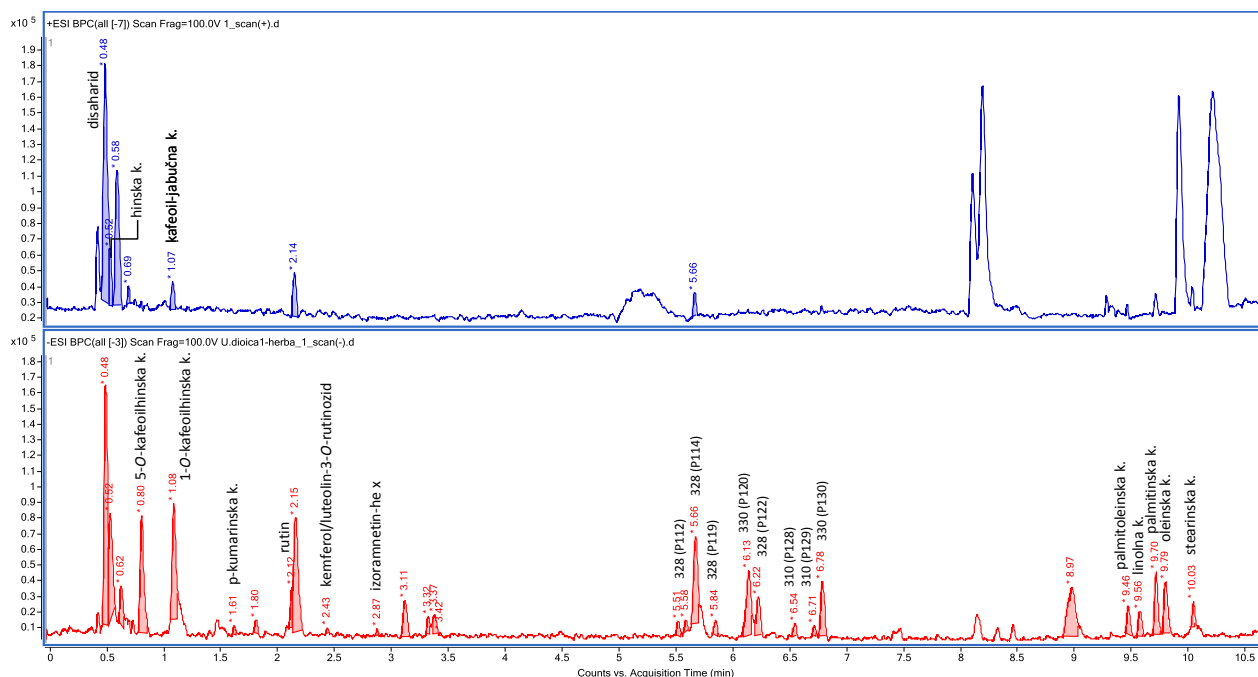
■ – visoka koncentracija komponente u ekstraktu; ■ – srednja konc; ■ – niska konc; det. – detektovano ali ispod granice kvantitacije; n.d. – nije detektovano.

4.1.4.1. Vrste iz roda *Urtica*

Urtica dioica – herba

Sa *Slika 4.26.* možemo zaključiti da je hromatogram ekstrakta herbe koprive snimljen u negativnom modu znatno složeniji od odgovarajućeg PI hromatograma, što je i očekivano s obzirom na bolju osetljivost koju NI obezbeđuje za fenolne komponente. Na NI hromatogramu (*Slika 4.26.*) jasno se izdvajaju grupe jedinjenja: u intervalu 0,5 - 1,7 min eluiraju fenolne kiseline; 2,0 - 3,0 min flavonoidni glikozidi; 5,5 - 6,8 min komponente $M_r = 310 - 330$; i kao poslednje eluiraju masne kiseline u intervalu 9,3 - 10,10 min. Kvantitativnom analizom identifikovane su dodatne fenolne kiseline i flavonoidni glikozidi ali zbog svoje niske koncentracije u ekstraktu nisu uočljivi u scan hromatogramu.

Od fenolnih kiselina identifikovane su: hinska (0,52 min; P2), 5-*O*-kafeoilhinska (hlorogenska k.) (0,80 min; P9a), 1-*O*-kafeoilhinska (1,08 min; P9b), kafeoil-jabučna (1,07 min; P17) i *p*-kumarinska kiselina (1,61 min; P25). U nižim koncentracijama su prisutne kiseline određene kvantitativnom analizom (poglavlje 4.3.): *p*-hidroksi-benzoeva (0,018 mg/g), protokatehinska (0,031), ferulna (0,045 mg/g) i kafena kiselina (0,151 mg/ml). Ovi rezultati su u saglasnosti sa do sada urađenim analizama hemijskog sastava ekstrakta koprive (Exarchou i sar. 2006; Kavtaradze i sar. 2001; Pinelli i sar. 2008; Budzianowski, 1991; Nencu i sar. 2012). Prema radu Buscar i saradnika (2006) u ekstraktu herbe vrste *U. dioica*, identifikovane su još dve fenolne kiseline: kafeoilvinska i *p*-kumaroilhinska, što ovim radom nije potvrđeno.



Slika 4.26. BPC hromatogram ekstrakta herbe vrste *U. dioica* (*pub*)
(plavi, gornji - pozitivan mod, crveni, donji - negativan mod)

U intervalu 2,0 - 3,0 min eluiraju flavonoidni glikozidi: rutin (2,12 min; P33), kemferol/luteolin-3-*O*-rutinozid (2,43 min; P48; izobarna jedinjenja) i izoramnetin-heksozid (2,87 min; P53) a kvantitativnom analizom je potvrđeno prisustvo kemferol-3-*O*-glukozida (0,060 mg/g) i kvercetin-3-*O*-glukozida (0,221 mg/ml). Ovi rezultati su u saglasnosti sa do sada identifikovanim glikozidima flavonoida u ekstraktima herbi koprive. (Exarchou i sar. 2006; Kavtaradze i sar. 2001; Pinelli i sar. 2008; Bucar i sar. 2006; Chaurasia i Wichtl, 1987). Interesantno je napomenuti da nisu detektovani (ni u kvalitativnoj a ni kvantitativnoj analizi) aglikoni gore navedenih glikozida. U radu Nencu i saradnika (2012), u ekstraktu lista koprive identifikovan je luteolin ali je ekstrakt pre analize hemijskog sastava podvrgnut hidrolizi tako da nije bilo moguće utvrditi da li je luteolin bio prisutan u obliku glikozida ili aglokona.

Dominantne komponente ekstrakta herbe koprive su hlorogenska kiselina (2,859 mg/g) i rutin (1,380 mg/g).

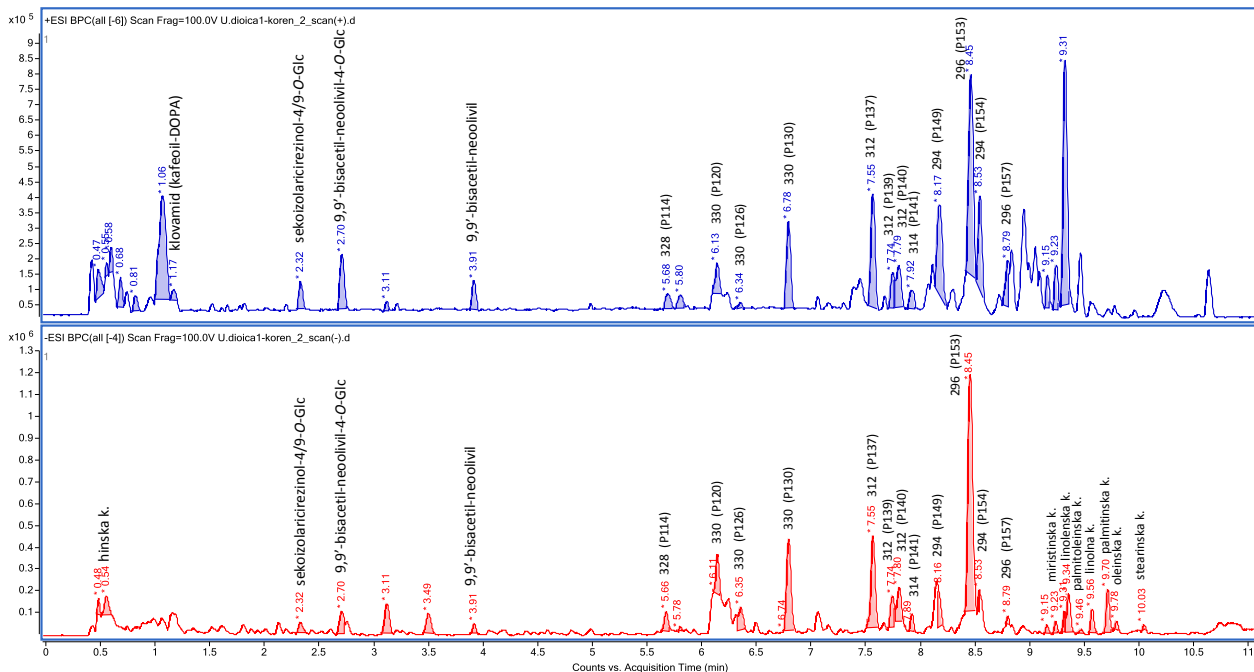
Kvantitativnom analizom utvrđeno je prisustvo kumarina – eskuletina (0,006 mg/g) i skopoletina (0,052 mg/g), kako su prisutni u veoma niskim koncentracijama, nisu bili uočljivi u BPC hromatogramu.

Komponente $M_w = 310 - 330$, pomenute u poglavlju 4.2.5., su grupisane i eluiraju u intervalu 5,5 - 6,8 min. Za svaki od pikova u ovom intervalu data je molekulska masa komponente kao i oznaka pika. U *Prilogu 8.3, Tabela 8.3.*, za svako od ovih komponenti su dati rezultati MS^2 analize, na osnovu kojih su ove komponente grupisane (imaju zajedničke jone u NI MS^2 spektrima $m/z = 229, 211, 171, 139$).

Masne kiseline eluiraju u intervalu 9,3 - 10,10 min i identifikovane su sledeće MK: palmitoleinska (9,46 min), linolna (9,56 min), palmitinska (9,70 min), oleinska (9,79 min) i stearinska kiselina (10,03 min).

Urtica dioica – koren

Sa hromatograma, snimljenim za ekstrakt korena vrste *U. dioica* u oba moda (*Slika 4.27.*), možemo zaključiti sa se identifikovana jedinjenja grupišu u sledećim intervalima: fenolne kiseline i njihovi derivati 0,5 - 1,2 min; lignani i njihovi derivati 2,3 - 4,0 min, komponente $M_w = 310 - 330$, 5,5 - 8,8 min i masne kiseline 9,3 - 10,1 min. U ekstraktu korena koprive nisu prisutne flavonoidne komponente, dok su, za razliku od ekstrakata herbi, detektovani lignani.



Slika 4.27. BPC hromatogram ekstrakta korena vrste *U. dioica* (*pub*) (plavi, gornji - pozitivan mod, crveni, donji - negativan mod)

Od fenolnih kiselina, u hromatogramu je detektovana samo hinska kiselina (0,54 min; P2) i derivat kafeolne kiseline - klovamid tj. kafeoil-DOPA (1,17 min; P18) koji je ovom analizom po prvi put detektovan u korenu koprive. Kvantitativnom analizom potvrđeno je prisustvo još četiri fenolne kiseline ali u veoma niskim koncentracijama: *p*-hidroksi-benzoeva (0,018 mg/g), protokatehinska (0,008), ferulna (0,025 mg/g) i *p*-kumarinska kiselina (0,114 mg/g).

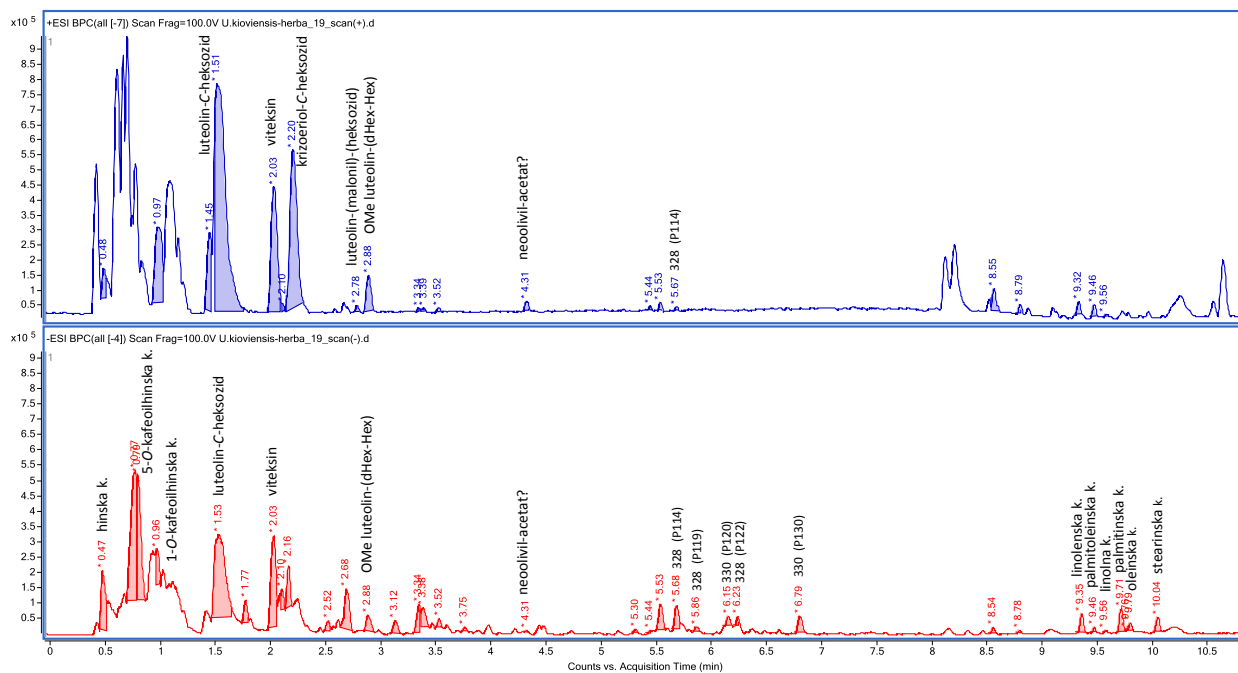
Za ekstrakt korena koprive karakteristično je prisustvo lignana, odnosno, njihovih derivata. Identifikovana su sledeća jedinjenja: sekoizolaricirezinol-4/9-*O*-glukozid (2,32 min; P38); 9,9'-bisacetil-

neoolivil-4-*O*-glukozid (2.70 min; P47) i 9,9'-bisacetil-neoolivil (3.91 min; P83). Sam sekoizolaricirezinol kao aglikon detektovan je samo kvantitativnom analizom i prisutan je u koncentraciji 0.062 mg/g. Pored ovih lignana, u literaturi je zabeleženo i prisustvo izolaricirezinola, pinorezinola, dehidrokoniferil alkohola i 3,4-divanililtetrahidrofurana, što u ovom radu nije potvrđeno, moguće zbog veoma niske koncentracije datih jedinjenja u samom ekstraktu (Schottner i sar. 1997a; Kraus i Spitteller, 1990; Schottner i sar. 1997b; Daniel i Wichtl, 1997).

Komponente koje dominiraju u drugom delu hromatograma (u intervalu 5,5 - 8,8 min) su prethodno komentarisane u poglavlju 4.2.5. Prema literaturnim podacima (Kraus i Spitteller, 1990; Farag i sar, 2013) jedinjenja ovih molekulske masa su okarakterisana kao derivati glikozida pinen-diola. Po mišljenju autora ove disertacije tumačenje spektara dato u radu Farag-a i saradnika (2013) je problematično i najverovatnije, pogrešno. S obzirom da nakon inkubacije ekstrakta sa β -glukozidazom nije došlo do hidrolize eventualne šećerne komponente, te tvrdnje su opovrgnute. Masne kiseline eluiraju u intervalu 9,3 - 10,10 min i identifikovane su sledeće: miristinska (9,31 min), linolenska (9,34 min), palmitoleinska (9,46 min), linolna (9,56 min), palmitinska (9,70 min), oleinska (9,78 min) i stearinska kiselina (10,03 min).

Urtica kioviensis – herba

Sa hromatograma, snimljenim za ekstrakt herbe vrste *U. kioviensis* u oba moda (Slika 4.28.), možemo zaključiti sa se identifikovana jedinjenja grupišu u sledećim intervalima: 0,4 - 1,2 min fenolne kiseline; 1,5 - 2,2 C-glikozidi flavonoida; 2,7 - 2,9 derivati lutolina; 5,6 - 6,8 komponente Mw = 310 - 330 i masne kiseline 9,3 - 10,10 min.



Slika 4.28. BPC hromatogram ekstrakta herbe vrste *U. kioviensis* (plavi, gornji - pozitivan mod, crveni, donji - negativan mod)

Od fenolnih kiselina su prisutne: hinska (0,47 min; P2), 5-*O*-kafeoilhinska (0,8 min; P9a) i 1-*O*-kafeoilhinska kiselina (1,08 min; P9b). Pored ovih, kvantitativnom analizom je potvrđeno prisustvo sledećih fenolnih kiselina: protokatehinske (0,025 mg/g), *p*-kumarinske (0,015 mg/g), ferulne (0,018 mg/g) i kafene (0,303 mg/g).

Veoma je interesantno da su *C*-glikozidi i derivati luteolina identifikovani isključivo u ekstraktima vrste *U. kioviensis*. Od *C*-glikozida prisutni su: luteolin-*C*-heksozid (1,53 min; P24), viteksin (2,03 min; P30) i krizoeriol-*C*-heksozid (2,20 min; P36), kao dominantni pikovi u PI hromatogramu. Kao dominantne komponente ekstrakta herbe *U. kioviensis*, kvantifikovane su 5-*O*-kafeoilhinska kiselina (13,68 mg/g) i viteksin (1,324 mg/g). Od derivata luteolina, pored njegovog *C*-glikozida, prisutni su *O*-metilovani luteolin diglikozid (deoksiheksoza i heksoza) na 2,88 min (P50), luteolin-(malonil)-(heksozid) na 2,78 min (P54) i kvantitativnom analizom je potvrđeno prisustvo luteolin-7-*O*-glukozida (0,342 mg/g). Glikozidi kvercetina su detektovani samo kvantitativnom analizom i to 3-*O*-glukozid (0,084 mg/g) i 3-*O*-ramnozid (0,074 mg/g - hiperozid).

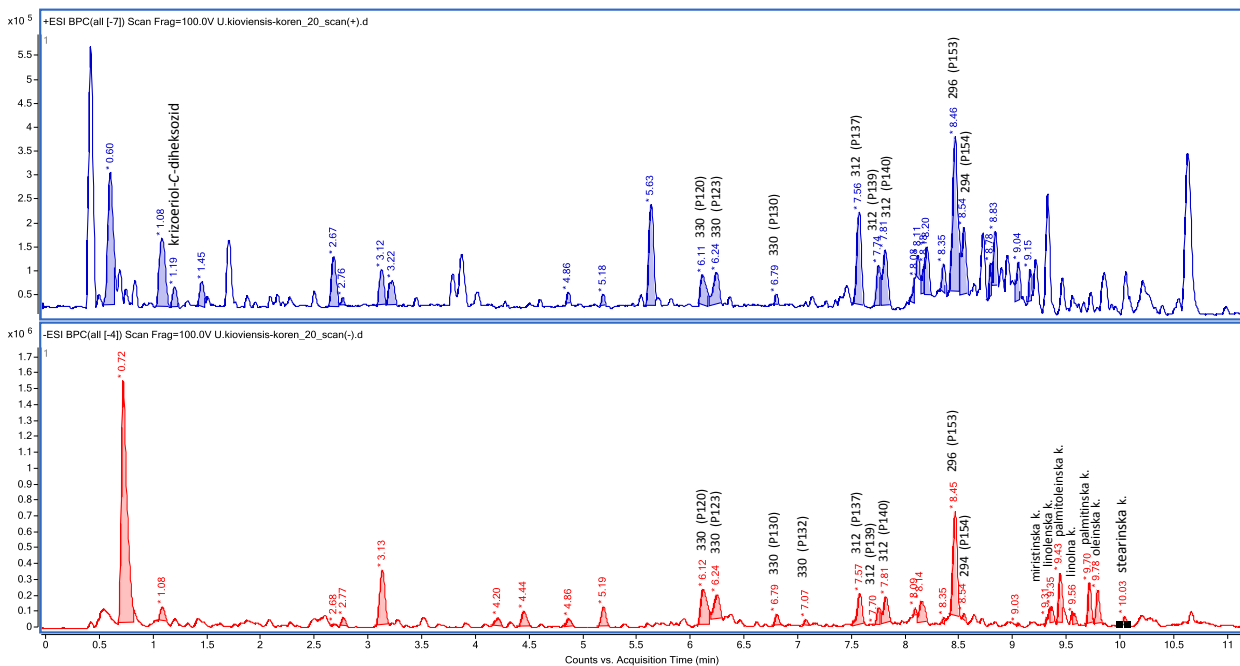
Jedinjenje (P94) koje eluira na 4,31 min ima molekulska masu i MS² spektar neoolivil-acetata (poglavlje 4.1.2.3.), međutim, derivati neoolivila su do sada pronađeni samo u ekstraktu korena vrste *U. dioica* pa se ne može sa sigurnošću tvrditi da je u pitanju ovo jedinjenje.

U ovom ekstraktu detektovano je pet komponenti Mw = 328 ili 330; u intervalu 5,6 - 6,8 min. Masne kiseline eluiraju u intervalu 9,3 - 10,10 min i identifikovane su sledeće masne kiseline: linolenska (9,36 min), palmitoleinska (9,46 min), linolna (9,56 min), palmitinska (9,71 min), oleinska (9,79 min) i stearinska kiselina (10,04 min).

Urtica kioviensis – koren

Scan analizom ekstrakta korena vrste *U. kioviensis* (Slika 4.29.), identifikovana je samo jedna fenolna komponenta - di-*C*-heksozid krizoeriola na 1,19 min (P19). Ostala jedinjenja pripadaju komponentama Mw = 310 - 330, odnosno masnim kiselinama, tj. jedinjenjima koja su detektovana u svim ostalim ispitivanim uzrcima. Rezultati kvalitativne analize, takođe, ukazuju na nizak sadržaj fenolnih komponenti, pri čemu su detektovane samo sledeće fenolne kiseline: *p*-hidroksibenzoeva (0,095 mg/g), protokatehinska (0,017 mg/g), *p*-kumarinska (0,091 mg/g), ferulna kiselina (0,025 mg/g) kao i kumarin - skopoletin (0,028 mg/g).

Od masnih kiselina prisutne su sledeće: miristinska (9,31 min), linolenska (9,36 min), palmitoleinska (9,43 min), linolna (9,56 min), palmitinska (9,71 min), oleinska (9,78 min) i stearinska kiselina (10,03 min).



Slika 4.29. BPC hromatogram ekstrakta korena vrste *U. kioviensis* (plavi, gornji - pozitivan mod, crveni, donji - negativan mod)

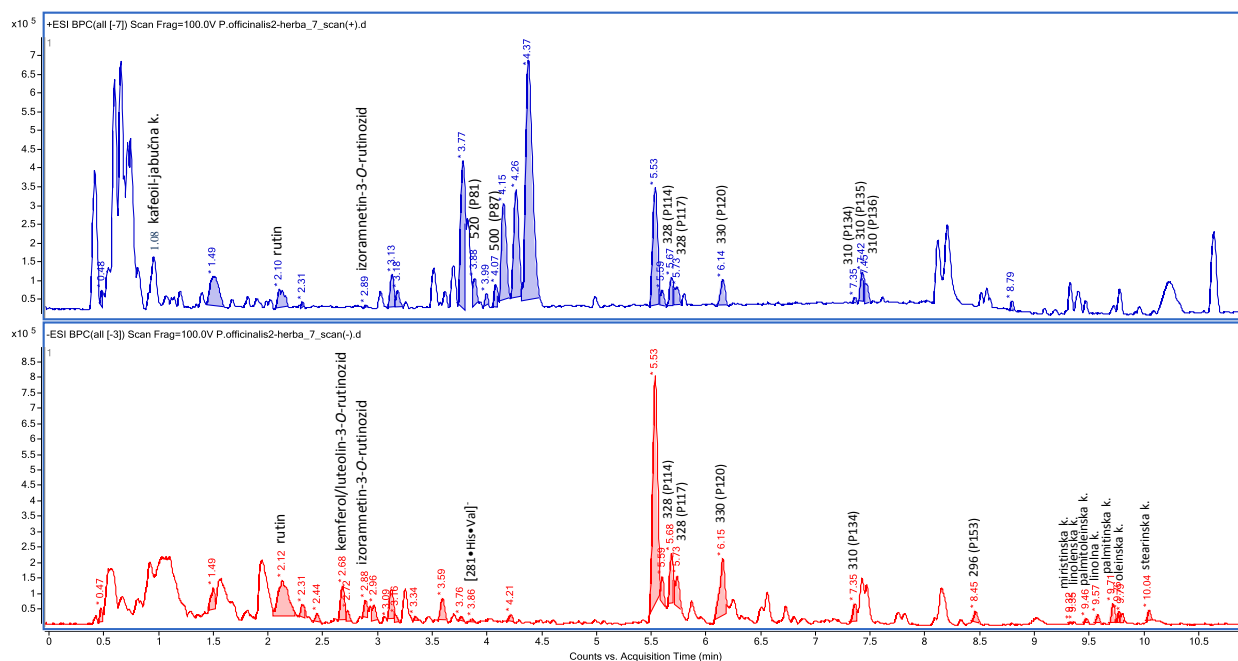
4.1.4.2. Vrste iz roda *Parietaria*

Parietaria officinalis – herba

Usled velikog broja ko-eluirajućih, veoma polarnih, komponenti na početku hromatograma (Slika 4.30., do 1,3 min) nije bilo moguće izvršiti identifikaciju tih komponenti. Utvrđeno je da u tom, početnom delu, hromatograma eluiraju fenolne i fenilpropanske kiseline, od koji je identifikovana jedino kafeoiljabučna (1,08 min; P17). Prisustvo ostalih jedinjenja ove dve klase potvrđeno kvantitativnom analizom: hinska (0,819 mg/g), kafena (0,172 mg/g) i 5-*O*-kafeoilhinska (0,307 mg/g) kao dominantne a *p*-hidroksibenzoeva (0,026 mg/g), protokatehinska (0,041 mg/g), *p*-kumarinska (0,038 mg/g) i ferulna kiselina (0,030 mg/g) u nižim koncentracijama.

U intervalu 2,0 - 3,0 min eluiraju flavonoidni glikozidi tj. rutinozidi: rutin (2,10 min; P33), kemferol/luteolin-3-*O*-rutinozid (2,68 min; P48; diferenciranje ova dva izobarna flavonoida nije bilo moguće) i izoramnetin-3-*O*-rutinozid (2,89 min; P55). Prisustvo 3-*O*-glukozida kemferola (0,045 mg/g) i kvercetina (0,283 mg/g) je potvrđeno kvantitativnom analizom. Pored ovih flavonoidnih glikozida, ranijim istraživanjima su identifikovani su 3-*O*-soforozidi kvercetina i kemferola kao i 3-*O*-neohesperidozidi kemferola i izoramnetina, u ekstraktu lista i cveta vrste *P. officinalis* (Budzianowsky i sar. 1985).

Detektovana su dva aminoacil-derivata (poglavlje 4.2.4.): [281·His·Val]- (3,75 min; P81) i [247·His·Leu]- (4,07 min; P87). U intervalu 5.5 - 8.5 min je eluiralo sedam komponenti Mw = 310 - 330. Od masnih kiselina su prisutne: miristinska (9,32 min), linolenska (9,35 min), palmitoleinska (9,46 min), linolna (9,57 min), palmitinska (9,71 min), oleinska (9,79 min) i stearinska kiselina (10,04 min).



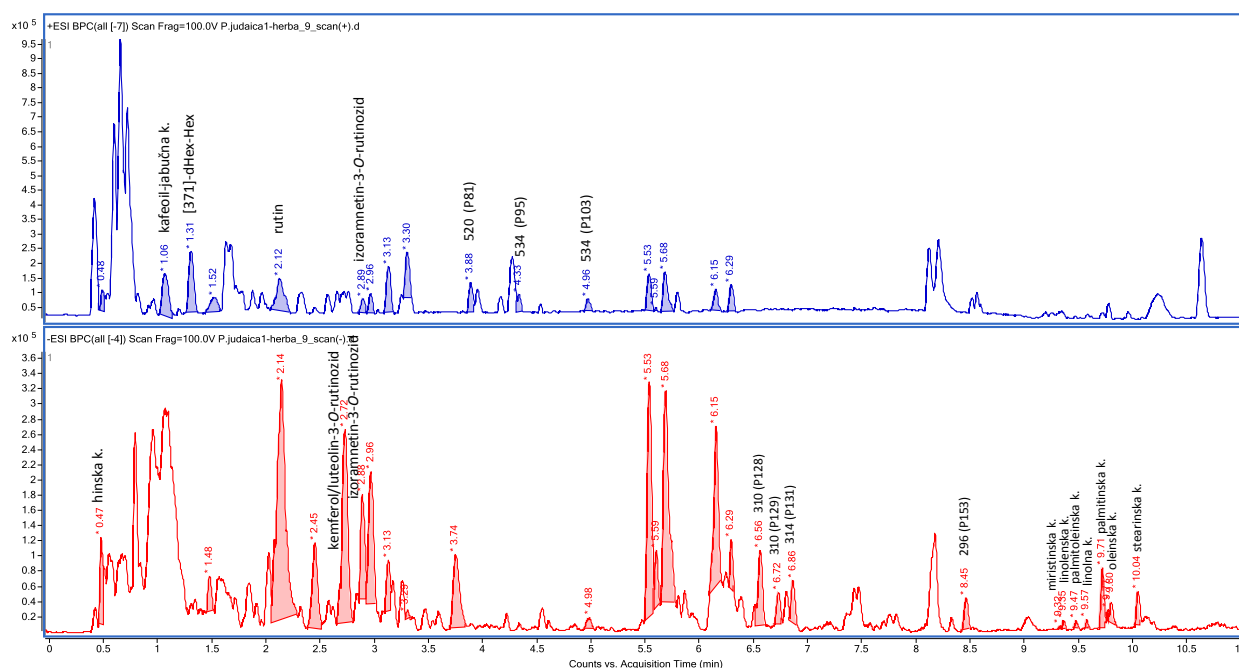
Slika 4.30. BPC hromatogram ekstrakta herbe vrste *P. officinalis2* (plavi, gornji - pozitivan mod, crveni, donji - negativan mod)

Parietaria judaica – herba

Isto kao u slučaju hromatograma herbe prethodne pomenute vrste, i u ovom slučaju nije bilo moguće razdvojiti i identifikovati tzv. rano eluirajuće pikove (do 1,3 min) na hromatogramu datom na *Slici 4.32*. Stoga je za potvrdu prisustva jedinjenja, pre svega fenolnih i fenilpropanskih kiselina, koja se nalaze u tom delu hromatograma primenjena kvantitativna analiza. Od ovih kiselina u hromatogramu su detektovane samo hinska (0,47 min; P2) i kafeoil-jabučna kiselina (1,06 min; P17) a kvantitativnom analizom je potvrđeno prisustvo: *p*-hidroksibenzojeve (0,077 mg/g), protokatehinske (0,115 mg/g), galne (0,015 mg/g), *p*-kumarinske (0,034 mg/g), ferulne (0,034 mg/g), kafene (0,150 mg/g) i 5-*O*-kafeoilhinske kiseline (0,376 mg/g). U ekstraktu herbe vrste *P. judaica* prisutni su flavan-3-oli: katehin (0,593 mg/g) i epikatehin (1,429 mg/g). Epikatehin je posle rutina (12,80 mg/g), drugo po zastupljenosti fenolno jedinjenje, dok je katehin prisutan jedino u ekstraktu herbe vrste *P. judaica* od svih ekstrakata herbi ispitivanih u ovom radu. Usled toga, flavan-3-oli, naročito katehin, su okarakterisani kao potencijalni taksonomski markeri za ovu vrstu (poglavlje 4.3.1.).

Flavonoidni glikozidi (tačnije rutinozidi) su grupisani u intervalu 1,3 - 2,9 min i to: rutin - dominantno fenolno jedinjenje (2,12 min; P33); kemferol/luteolin-3-*O*-rutinozid (2,72 min; P48) i izoramnetin-3-*O*-rutinozid (2,88 min; P55). Pored ovih, kvantitativnom analizom je potvrđeno prisustvo 3-*O*-glukozida kemferola (0,100 mg/g) i kvercetina (1,014 mg/g).

Detektovana su tri aminoacil-konjugata na 3,88 min (P81), 4,33 min (P95) i 4,96 min (P103); četiri komponente $M_w = 310 - 330$ i od masnih kiselina: miristinska (9,32 min), linolenska (9,35 7min), palmitoleinska (9,46 min), linolna (9,57 min), palmitinska (9,71 min), oleinska (9,80 min) i stearinska kiselina (10,04 min).



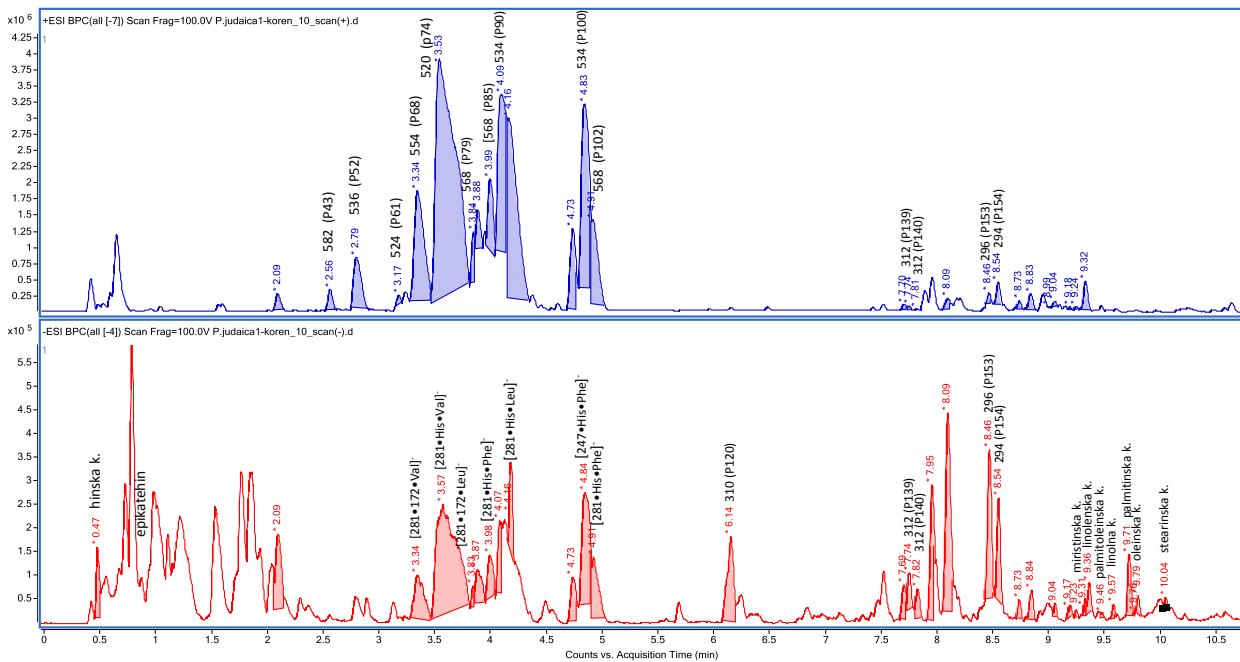
Slika 4.32. BPC hromatogram ekstrakta herbe vrste *P. judaica* 1 (plavi, gornji - pozitivan mod, crveni, donji - negativan mod)

Parietaria judaica – koren

Početni deo hromatograma (Slika 4.33.), naročito snimljenog u negativnom modu, zbog velikog broja ko-eluirajućih komponenti je neinformativan. I u ovom slučaju, rezultati su upotpunjeni kvantitativnom analizom. Od fenolnih komponenti u NI hromatogramu identifikovane su samo dominantne komponente: hinska kiselina (0,48 min; P2) i epikatehin (0,95 min; P12). Kvantitativnom analizom je utvrđeno prisustvo: 5-*O*-kafeoilhinske kiseline (0,483 mg/g), katehina (0,458 mg/g) i rutina (0,157 mg/g).

Detektovano je pet komponenti $M_w = 310 - 330$, a od masnih kiselina: miristinska (9,31 min), linolenska (9,36 min), palmitoleinska (9,46 min), linolna (9,57 min), palmitinska (9,71 min), oleinska (9,79 min) i stearinska kiselina (10,04 min).

Kao i u hromatogramima ekstrakta korena vrste *P. officinalis*, i u ovim hromatogramima dominantni pikovi potiču od amioacil-derivata. Nema značajne kvalitativne razlike između ova dva ekstrakta korena tj. u oba ekstrakta su prisutne sve kombinacije osnovnog skeleta, histidina kao prve aminokiseline (vezane direktno za osnovni skelet) i preostale četiri aminokiseline na drugom mestu (pretpostavlja se da su vezane za histidin - „prvu“ aminokiselinu). I ovde su prisutna dva izuzetka kao i kod prethodne vrste na 2,56 min i 2,79 min.



Slika 4.33. BPC hromatogram ekstrakta korena vrste *P. judaica1* (plavi, gornji - pozitivan mod, crveni, donji - negativan mod)

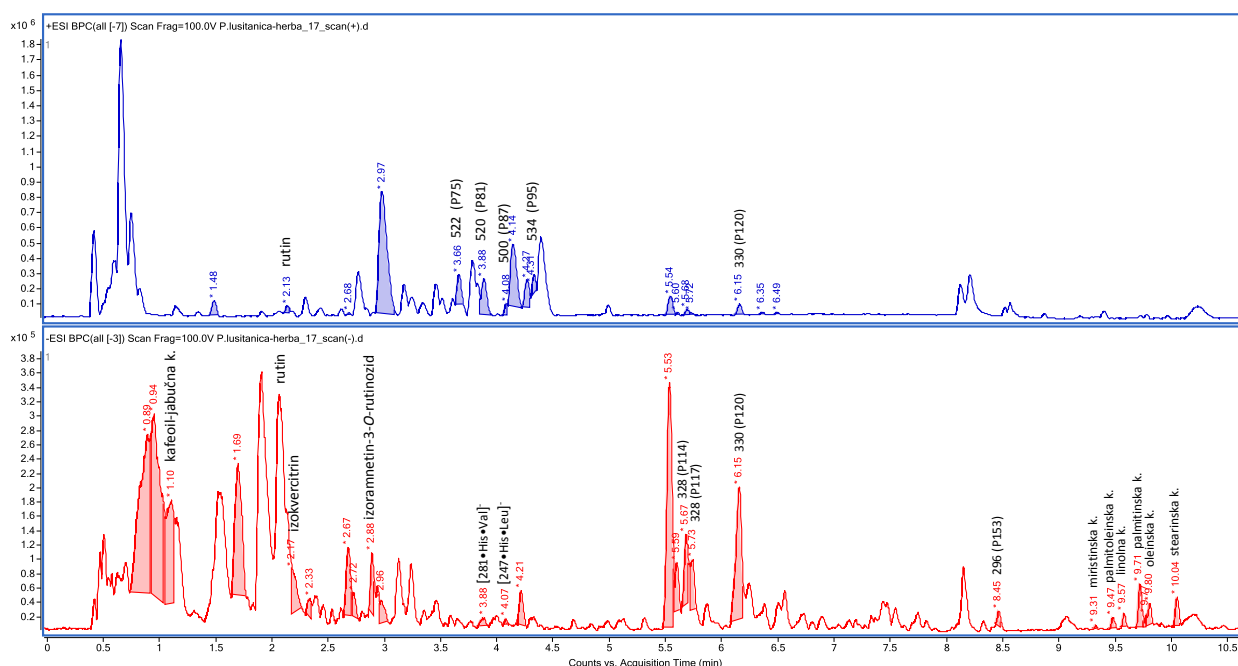
Parietaria lusitanica – herba

Slično hromatogramima prethodne dva vrste iz roda *Parietaria*, u početnom delu hromatograma (Slika 4.34.) prisutan je veliki broj ko-eluirajućih komponenti pa je potvrdu prisustva fenolnih i fenilpropanskih kiselina opet poslužila kvantitativna analiza. Jedina fenolna kiselina detektovana u NI hromatogramu je kafeoil-jabučna kiselina (1,10 min; P17). Pored nje, kvantitativnom analizom je potvrđeno prisustvo: *p*-hidroksibenzoeve (0,011 mg/g), protokatehinske (0,052 mg/g), galne (0,011 mg/g), *p*-kumarinske (0,014 mg/g), ferulne (0,024 mg/g), kafene (0,180 mg/g) i 5-*O*-kafeoilhinske kiseline (0,414 mg/g). Od kvantifikovani jedinjenja, dominantna su: hinska kiselina (1,114 mg/g), epikatehin (1,041 mg/g) i rutin (3,713 mg/g).

U intervalu 2,1 - 2,9 min identifikovana su tri glikozida flavonoida: pomenuti rutin (2,13; P33), izokvercitrin (2,17 min; P35) i izoramnetin-3-*O*-rutinozid (2,88 min; P55). Izokvercitrin tj. kvercetin-3-*O*-glukozid je identifikovan samo u hromatogramu ovog ekstrakta, kod svih drugih vrsta je njegovo prisustvo potvrđeno samo kvantitativnom analizom dok je izoramnetin-3-*O*-rutinozid detektovan isključivo u ekstraktima herbi vrsta iz roda *Parietaria*.

Detektovano je šest aminoacil-derivata, u intervalu 3,6 - 4,5 min, i jedino u ovom ekstraktu je pored četiri ranije pomenute aminokiseline, utvrđeno prisustvo aminokiseline metionina u jedinjenju označenom kao [247·172·Met]- koje predstavlja izuzetak jer kao prvu aminokiselinu nema histidin već gubi fragment od $\Delta m/z = 172$.

Prisutne su i četiri komponente $M_w = 310 - 330$, i od masnih kiselina: miristinska (9,31 min), palmitoleinska (9,47 min), linolna (9,57 min), palmitinska (9,71 min), oleinska (9,80 min) i stearinska kiselina (10,04 min) - za razliku od ostalih ekstrakata, u ovom nije identifikovana linolenska kiselina.



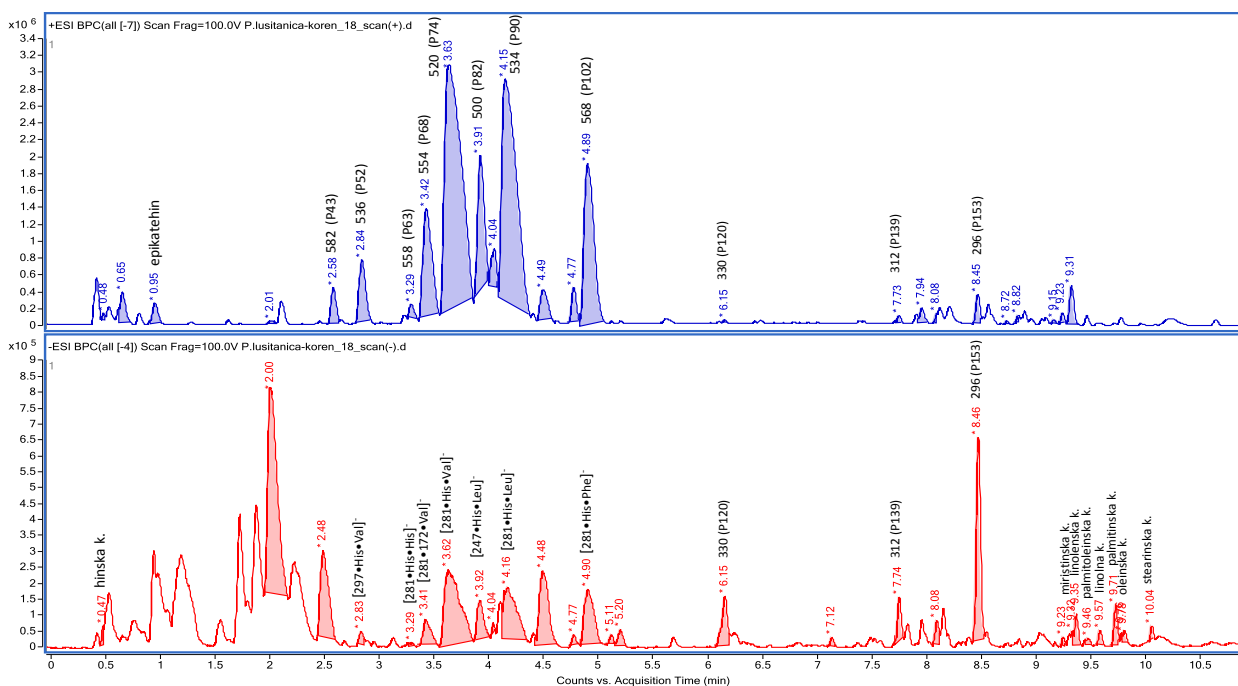
Slika 4.34. BPC hromatogram ekstrakta herbe vrste *P. lusitanica*1 (plavi, gornji - pozitivan mod, crveni, donji - negativan mod)

Parietaria lusitanica – koren

Slično ekstraktu korena vrste *P. judaica*, u hromatogramu ekstrakta korena vrste *P. lusitanica* (Slika 4.35.) identifikovane su samo dve fenolne komponente: hinska kiselina (0,47 min; P2; 0,890 mg/g) i epikatehin (0,95 min; P12; 14,51 mg/g) koje, zajedno sa 5-*O*-kafeoilhinskom kiselinom (3,291 mg/g), predstavljaju najzastupljenije kvantifikovane komponente ovog ekstrakta. Pored ovih fenolnih komponenti, kvantitativnom analizom je potvrđeno prisustvo sledećih: *p*-hidroksibenzojeve (0,021 mg/g), protokatehinske (0,035 mg/g), ferulne kiseline (0,050 mg/g), katehina (0,158 mg/g) i dva glikozida kvercetina - rutin (0,137 mg/g) i kvercetin-3-*O*-glukozid (0,044 mg/g).

Tipično za sve hromatograme ekstrakata korenja vrsta roda *Parietaria* je da dominiraju pikovi (naročito u PI hromatogramu) jedinjenja preliminarno identifikovanih kao aminoacil-derivati. U odnosu na ekstrakte korena vrsta *P. officinalis* i *P. judaica*, kod ovog ekstrakta je prisutno dva jedinjenja manje ali su zastupljene sve „kombinacije“ osnovnog skeleta, histidina kao „prve“ aminokiseline i preostale četiri aminokiseline na „drugom“ mestu. Kao izuzeci se, i u ovom slučaju, javljaju jedinjenja na 2,68 min (P43) sa osnovnim skeletom od 482 (i gubitkom samo jednog aminokiselnog ostatka – valina), i na 2,81 min (P52) gde osnovni skelet ima $M_r = 298$.

Prisutne su svega tri komponente $M_w = 310 - 330$, i od masnih kiselina: miristinska (9,31 min), linolenska (9,36 min), palmitoleinska (9,46 min), linolna (9,57 min), palmitinska (9,71 min), oleinska (9,79 min) i stearinska kiselina (10,04 min).



Slika 4.35. BPC hromatogram ekstrakta korena vrste *P. lusitanica* 1 (plavi, gornji - pozitivan mod, crveni, donji - negativan mod)

4.1.5. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih fenola i flavonoida

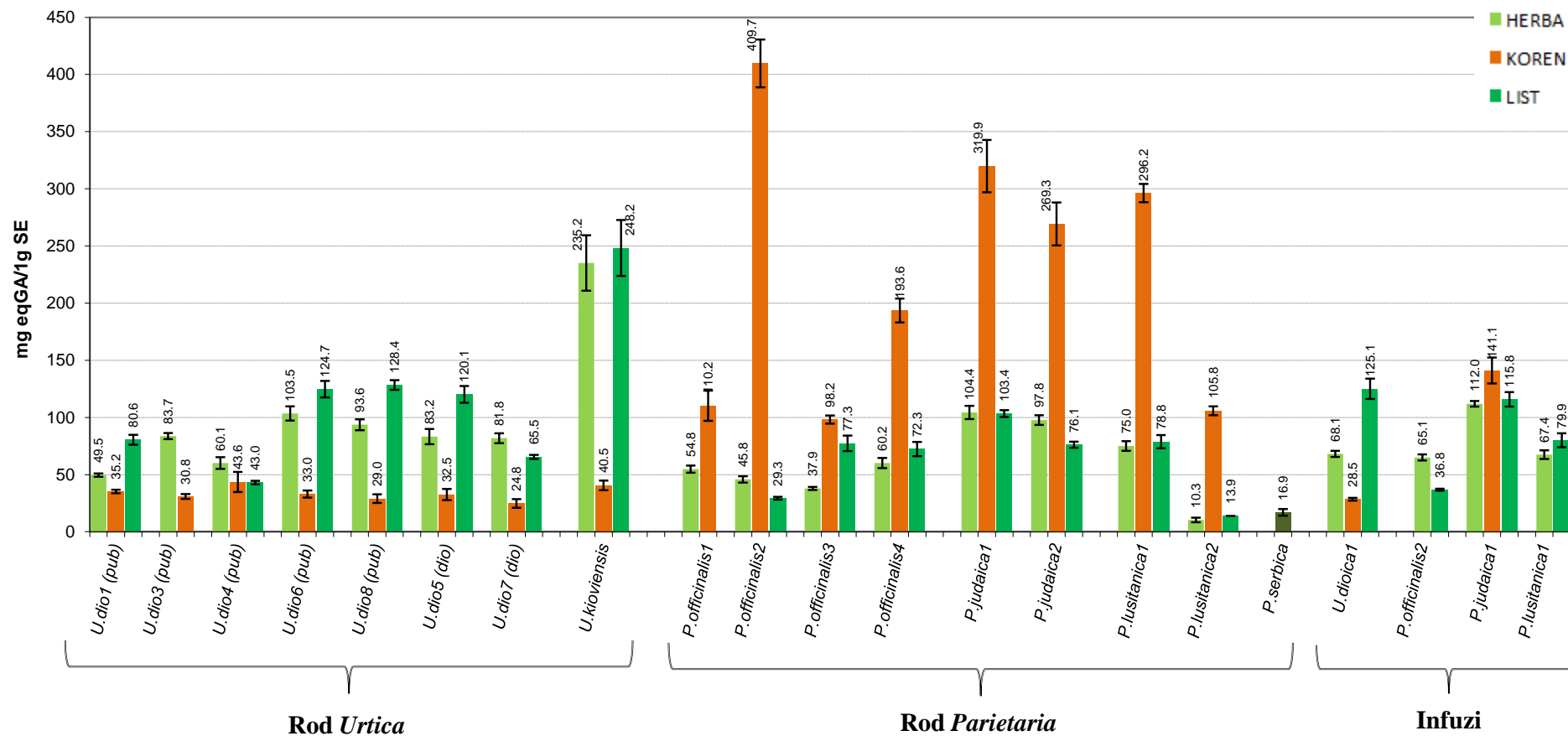
Ukupna fenolna jedinjenja

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u metanolnim i vodenim ekstraktima određen je metodom po Folin-Ciocalteu, u kojoj fenolne komponente ekstrakta vrše redukciju FC reagensa. Zbog ovakvog principa, ova metoda se sve više smatra metodom za određivanje redukcionih sposobnosti pošto kao reducensi mogu da deluju i druge, nefenolne komponente ekstrakta (kao što su peptidi, vitamin C, itd.) i daju lažno pozitivne rezultate (Everette i sar, 2010). Ukupni fenoli su određeni u metanolnim ekstraktima herbi, korena i lista ispitivanih vrsta sa svih lokaliteta kao i infuzima (vodenim ekstraktima) herbi i korena odabranih vrsta. Rezultati su prikazani na histogramu (*Slika 4.36.* i u *Prilogu 8.5., Tabele 8. 15. i 16.*) izraženi kao mg ekvivalenta galne kiseline po 1 g suvog ekstrakta (mg eqGA/g SE). Prema dobijenim rezultatima može se zaključiti da je zastupljenost fenolnih komponenti u ekstraktima herbi i korena potpuno različita u ova dva roda. U ekstraktima vrsta roda *Urtica*, veći sadržaj fenolnih jedinjenja je određen u nadzemnim delovima (herba: 49,3 - 235,2 i list: 65,5 - 248,2 mg eqGA/g SE) dok je u ekstraktima korena sadržaj ukupnih fenola bio izuzetno nizak (24,8 - 43,6 mg eqGA/g SE). U okviru ovog roda, dvostruko bogatiji fenolnim komponentama su ekstrakti herbe i lista vrste *U. kioviensis* u odnosu na ekstrakte vrste *U. dioica*. Potpuno suprotna situacija je kod ekstrakata vrsta roda *Parietaria* gde je izuzetno visok sadržaj ukupnih fenola određen upravo u ekstraktima korena (98,2 - 409,7 mg eqGA/g SE). Sa ubedljivo najvišim sadržajem ukupnih fenola izdvaja se ekstrakt korena *P. officinalis* sa 409,7 mg eqGA/g SE. Rezultati dobijeni u ovom eksperimentu su u saglasnosti sa kvantitativnom LC-MS/MS analizom ekstrakata. Primenom hromatografske tehnike takođe je definisana ista distribucija fenolnih jedinjenja kao i primenom ove spektrofotometrijske metode: u nadzemnim delovima vrsta roda *Urtica* ima više fenolnih komponenti u odnosu na koren, dok je kod vrsta roda *Parietaria* obrnuto. Distribucija ukupnih fenola između infuza nadzemnih organa i korena je ista kao kod metanolnih ekstrakata – bogatiji fenolima su infuzi nadzemnih organa *Urtica* vrsta a kod *Parietaria* vrsta infuzi korena. Međutim, infuzi herbi i lista su imali veći sadržaj ukupnih fenola u odnosu na odgovarajuće metanolne ekstrakte dok je kod infuza korenja obrnuto.

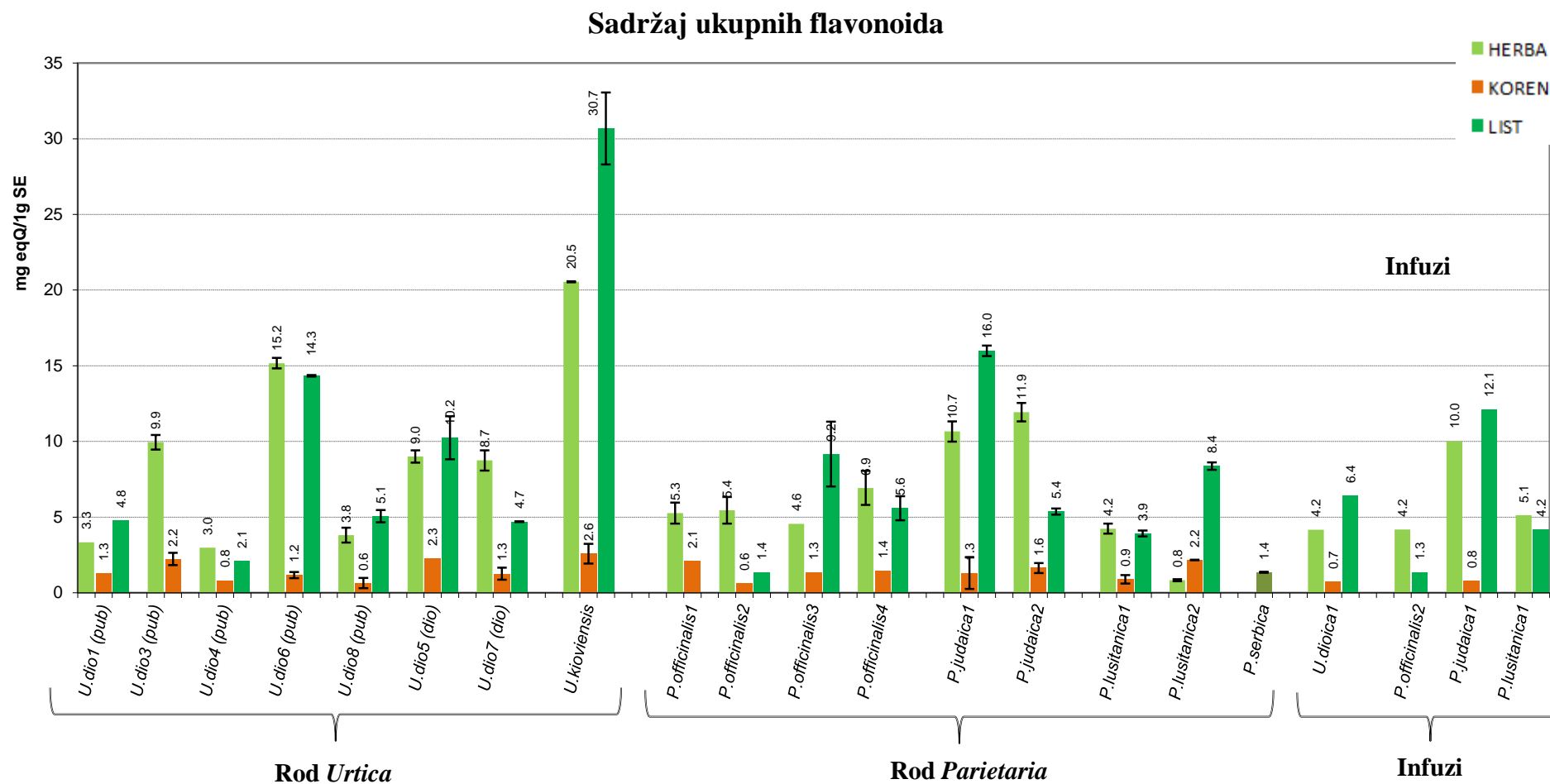
Ukupni flavonoidi

Rezultati određivanja ukupnih flavonoida metodom kompleksiranja jona Al^{3+} izraženi su kao mg ekvivalenta kvercetina po 1 g suvog ekstrakta (mg eqQ/1g SE) i dati su na histogramu (*Slika 4.37.* i u *Prilogu 8.5., Tabele 8. 17. i 18.*). U ovom slučaju, distribucija flavonoidnih komponenti je uniformna: veći sadržaj je određen u ekstraktima nadzemnih organa (herba i list) kod svih ispitivanih vrsta. Ovo se može objasniti ulogom flavonoida da štite biljku od UV zračenja te su lokalizovani u nadzemnom delu biljke koji je izložen zračenju. Između uzoraka iste vrste sa različitih lokaliteta uočava se znatna varijabilnost u količini ukupnih flavonoida. Kao vrsta sa najvećim sadržajem flavonoida izdvaja se *U. kioviensis* u čijim ekstraktima herbe i lista je određeno 20,5 odnosno, 30,7 mg eqQ/1g SE. Ovi rezultati nisu u saglasnosti sa rezultatima dobijenim primenom kvantitativne LC-MS/MS analize prema kojima je u ekstraktima korena vrsta roda *Parietaria* određeno znatno veća količina flavonoida u odnosu na ekstrakte herbi. Ovo se može objasniti time što su kao dominantni flavonoidi u ekstraktima korena *Parietaria* vrsta identifikovani flavan-3-oli: katehin i epikatehin. Za kompleksiranje Al^{3+} jona veoma je bitna okso grupa u položaju 4, te su ovi flavonoidi u ovom testu „nevidljivi“. Stoga, rezultate dobijene spektrofotometrijskim određivanjem ukupnih flavonoida metodom kompleksiranja Al^{3+} jona treba uzimati sa dozom rezerve i proveriti rezultate primenom neke univerzalnije metode.

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja



Slika 4.36. Rezultati određivanja ukupnih fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima i infuzima ispitivanih vrsta.



Slika 4.37. Rezultati određivanja ukupnih flavonoida u metanolnim ekstraktima i infuzima ispitivanih vrsta.

4.2. ANTIOKSIDANTNA AKTIVNOST EKSTRAKATA

Slobodno radikalske vrste u organizmu, naročito kiseonične (ROS) i azotne (RNS), interakcijom sa biomolekulima mogu izazvati brojna oštećenja. Radikalske čestice mogu da više oksidativno oštećenje lipida pri čemu se narušava struktura i funkcija ćelijskih membrana. Oksidacijom proteina menja se njihova trodimenzionalna struktura a, samim tim, najčešće i funkcija. Mutacije u naslednom materijalu mogu biti posledica reakcija slobodnih radikala sa azotnim bazama i šećernim komponentama nukleotida. Oksidativna oštećenja ćelijskih struktura igraju važnu ulogu u razvoju brojnih kardiovaskularnih, neurodegenerativnih i kancerogenih obolenja kao i samom starenju organizma. Postoje brojni mehanizmi antioksidantne zaštite u organizmu koji sprečavaju oštećenja izazvana reaktivnim vrstama. Međutim, u slučaju povećanje produkcije ROS-a, poželjno je unošenje egzogenih antioksidanata kako bi se povećao kapacitet odbrane organizma.

Hrana biljnog porekla predstavlja najbogatiji izvor egzogenih antioksidanata, pre svega biljnih fenola. Takođe, u današnje vreme, postoji veliki broj fitopreparata i dijetetskih suplemenata koji imaju antioksidantno delovanje i kao aktivne komponente upravo biljne fenole. Svoje antioksidantno dejstvo fenolne komponente ispoljavaju tako što doniraju H• i na taj način neutrališu slobodni radikal a sami postaju fenoksil radikali koji su stabilizovani delokalizacijom (poglavlje 2.3.1.). Dodatno, fenolne komponente, naročito flavonoidi, helatiraju jone prelaznih metala i sprečavaju nastanak slobodnih radikala u Fentonovoj i Haber-Weiss-ovoj reakciji. Međutim, poznato je da samo jedan antioksidant može imati i pro-oksidativne efekte u zavisnosti od njegove koncentracije i njegovog mikrookruženja, kao na primer vitamin C ili β-karoten (Poljšak i Raspor, 2008). Stoga, veću prednost treba dati unošenju većeg broja antioksidanata sa različitim mehanizmom dejstva. U tom pogledu, naročito su interesantni biljni ekstrakti bogati biljnim fenolima.

Postoji izuzetno velik broj metoda za procenu antioksidantnog potencijala biljnih ekstrakata. Međutim, usled toga, sve je teže porediti rezultate dobijene u različitim laboratorijama te se javlja potreba da se te metode standardizuju (Sanchez-Moreno, 2002). Usled velike raznovrsnosti reaktivnih vrsta prisutnih u organizmu, postoji i više mehanizama antioksidantnog delovanja. Svaki test pruža različite informacije o antioksidantnom mehanizmu delovanja komponenti ekstrakta. Da bi se procenio kompletan antioksidantni potencijal nekog biljnog ekstrakta potrebno ga je testirati u više model sistema (Singh i Singh, 2008). Uglavnom se testovi za procenu antioksidantnog potencijala mogu podeliti na one koje pružaju informacije o sposobnosti ekstrakta da spreči formiranje RS ili da ih neutrališe. U ovom radu, antioksidantni potencijal ispitivanih ekstrakata je određen njihovom sposobnošću da neutrališu sledeće radikale *in vitro*: DPPH•, NO•, SOA i •OH radikal. U testu inhibicije lipidne peroksidacije procenjena je sposobnost ekstrakata da zaustavljaju lančanu reakciju i smanje oštećenja lipida. Testovi neutralizacije •OH radikala i inhibicije lipidne peroksidacije pružaju informacije o sposobnosti ekstrakata da spreče nastajanje RS helatiranjem jona gvožđa. Uporedo sa ekstraktima ispitane su i aktivnosti sintetičkih antioksidanata BHA (butilovani hidroksianizol, E320), BHT (butilovani hidroksitoluen, E321) i PG (propil galat, E310) koji se koriste kao aditivi u različitim prehrambenim i kozmetičkim proizvodima. Rezultati ovih testova su dati kao IC₅₀ vrednosti tj. koncentracija ekstrakta potrebna za neutralizaciju 50% određene radikalske vrste i prikazani su u *Prilogu 8.6. (Tabele 8.19.–8.23.)*. FRAP testom se procenjuje redukciona sposobnost ekstrakata i rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta askorbinske kiseline (ascorbic acid - AA) po 1g suvog ekstrakta (mg eqAA/g SE) (*Prilog 8.6. (Tabele 8.24. i 8.25.)*).

DPPH test

Jedan od najčešćih testova za antioksidantni skrining ekstrakata je DPPH test kao veoma jednostavan i ekonomičan. U ovom testu se određuje sposobnost komponenti ekstrakta da doniraju vodonikov atom i time neutrališu azot-centrirani 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil-radikal koji je stabilan i

komercijalno dostupan. Svi ispitivani ekstrakti su pokazali sposobnost neutralizacije DPPH radikala (Slika 4.38.), pri čemu su se IC_{50} vrednosti kretale u opsegu 2,1 - 130,4 $\mu\text{g/mL}$. Slično rezultatima određivanja ukupnih fenola, i ovde je izražena velika razlika u aktivnosti ekstrakata korena između vrsta koje pripadaju rodovima *Urtica* i *Parietaria*. Naime, ekstrakti korena vrsta roda *Parietaria* su ispoljili izuzetnu sposobnost neutralizacije DPPH[•] radikala sa IC_{50} vrednostima u opsegu 2,1 - 5,5 $\mu\text{g/mL}$ što je uporedivo sa aktivnošću sintetskih antioksidanata BHA (butilovani hidroksianizol), PG (propil galat) i BHT (butilovani hidroksitoluen) kao i samog kvercetina i rutina. Suprotno tome, ekstrakti korena vrsta roda *Urtica* su bili znatno slabiji hvatači ovog radikala sa IC_{50} vrednostima u opsegu 57,1 - 130,4 $\mu\text{g/mL}$. Aktivnosti ekstrakata nadzemnih organa (herbi i lista) svih ispitivanih vrsta su se kretale u opsegu $IC_{50} = 3,5 - 58,1$ $\mu\text{g/mL}$ (najaktivniji ekstrakt herbe *U. kioviensis*) te se može zaključiti da imaju dosta dobru sposobnost neutralizacije DPPH[•] radikala. Međutim, primećuje se značajna varijabilnost u aktivnosti ekstrakata iste vrste sa različitim lokaliteta. Ovo je naročito izraženo kod ekstrakata herbi i lista vrste *U. dioica*.

Sumarno, rezultati ovog testa ukazuju na različitu distribuciju aktivnih komponenti u vrstama ova dva roda. Dok su u vrstama roda *Urtica* one skoncentrisane u nadzemnim organima, kod vrsta roda *Parietaria* se nalaze u korenu. Vodeni ekstrakti ili infuzi su ispoljili nižu aktivnost (više IC_{50} vrednosti) u odnosu na odgovarajuće metanolne ekstrakte.

SOA test

Superoksid anjon radikal (SOA, $O_2^{\cdot-}$) nastaje jedno-elektronskom redukcijom molekula kiseonika. U organizmu najčešće nastaje kada, u stanju stresa, enzimi kao što su NADPH oksidaza i ksantin oksidaza predaju elektron molekulu kiseonika umesto redovnom elektron-akceptoru. Sam SOA je nestabilan i kratkoživeći radikal. Može da intereaguje sa biomolekulima ali je posrednik većih oštećenja kao prekursor znatno štetnijeg OH radikala u prisustvu jona prelaznih metala.

U ovom testu određena je sposobnost ekstrakata da neutrališu SOA nastao redukcijom kiseonika iz vazduha fenazinmetilsulfatom (PMS). Rezultati, odnosno IC_{50} vrednosti, su predstavljene na histogramu (Slika 4.39.). Uočava se da ekstrakti korena vrsta roda *Urtica* nisu uspeli da neutrališu 50% SOA radikala u ispitivanom opsegu koncentracija. Ovo se može objasniti veoma slabom rastvorljivošću ovih ekstrakata u vodenoj sredini u kojoj se odvija eksperiment. U prilog tome ide i rezultat za vodeni ekstrakt korena koprive koji ima izuzetno nisku IC_{50} vrednost od 21,4 $\mu\text{g/mL}$. Naspuprot tome, kao i u prethodnom testu, ekstrakti korena *Parietaria* vrsta su bili aktivniji u odnosu na ekstrakte nadzemnih organa (IC_{50} vrednosti u opsegu 20,9 - 64,5 $\mu\text{g/mL}$). Ipak, ubedljivo najaktivniji ekstrakt predstavlja ekstrakt herbe vrste *U. kioviensis* koji je već pri koncentraciji od 2,60 $\mu\text{g/mL}$ neutralisao 50% SOA radikala. Time je ispoljio veću aktivnost u odnosu na primenjene standarde PG, kvercetin i rutin. Za razliku od infuza korena vrste *U. dioica*, ostali infuzi su ispoljili slabiju (ili istu) sposobnost neutralizacije superoksid anjon radikala u odnosu na odgovarajuće metanolne ekstrakte.

NO test

NO je molekul koji ispoljava dvojake efekte u organizmu. S jedne strane, kao signalni molekul ima veoma bitnu ulogu u brojnim fiziološkim procesima koji se odvijaju u različitim ćelijama organizma. Suprotno tome, NO radikal u reakciji sa superoksid anjon radikalom daje visoko reaktivni peroksinitrit i dovodi do nitrozativnog stresa. Sposobnost ispitivanih ekstrakata neutrališu NO[•] radikale određena je pomoću Griess-ovog reagensa, metodom Green-a i saradnika (1982). Rezultati su predstavljani na histogramu (Slika 4.40.). Za razliku od prethodna dva testa, u ovom testu nije registrovana razlika u aktivnosti ekstrakata korena vrsta iz rodova *Urtica* i *Parietaria*. Naime, ekstrakti korena svih ispitivanih vrsta su bili lošiji u neutralizaciji NO radikala u odnosu na odgovarajuće ekstrakte nadzemnih organa. Čak ekstrakti korena vrste *P. judaica* nisu dostigli IC_{50} u ispitivanom opsegu koncentracija, iako su bili izuzetno

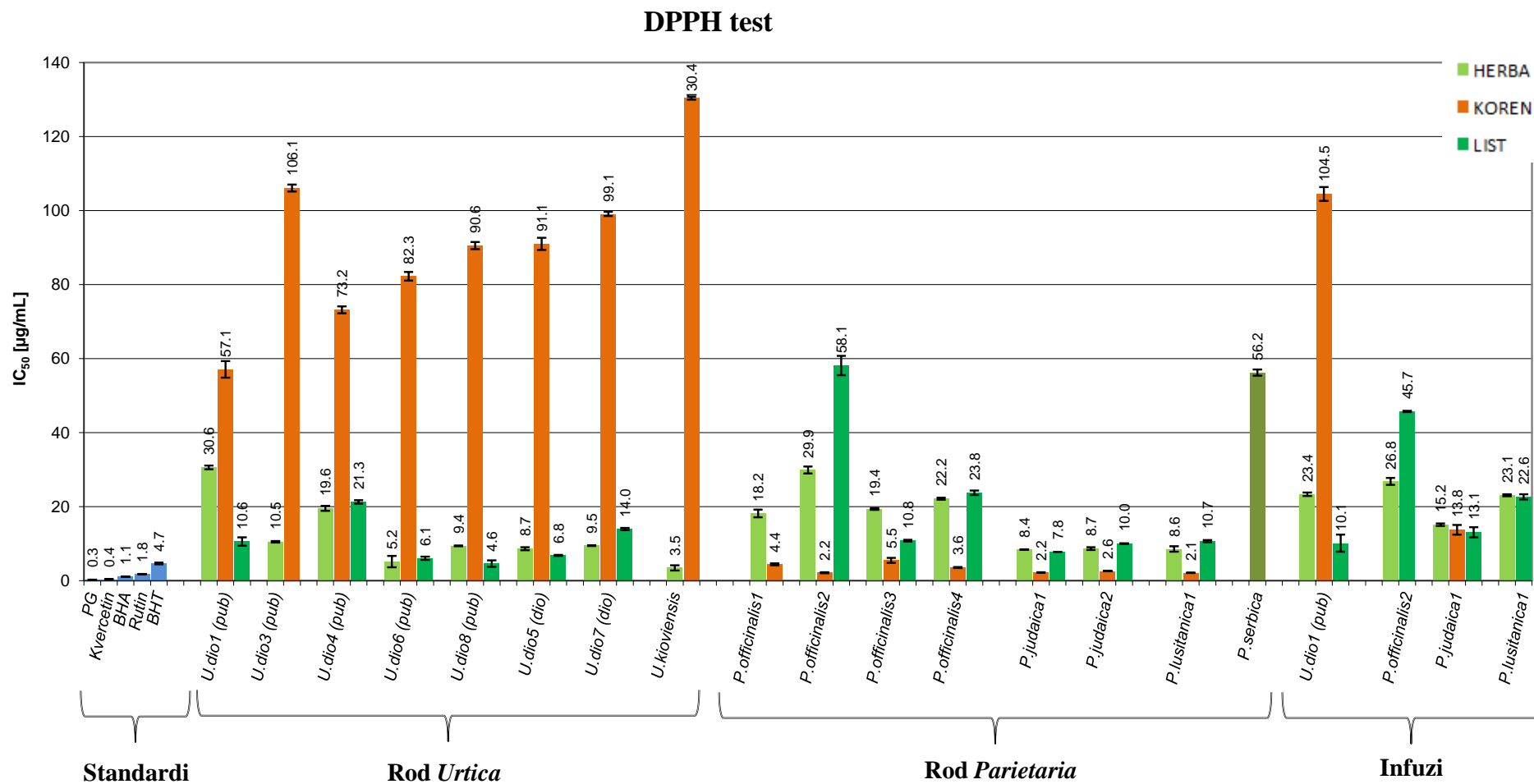
aktivni u DPPH i SOA testu, ukazujuću na sasvim drugačije mehanizme neutralizacija ovih radikalskih vrsta. I u ovom testu je primetna značajna varijabilnost u aktivnosti ekstrakata iste vrste sa različitim lokaliteta, opet najočiglednije u slučaju ekstrakata herbi i lista vrste *U. dioica* (IC₅₀ vrednosti u opsegu 68 - 364 µg/mL i 63 - 519 µg/mL, respektivno). Generalno, ekstrakti nadzemnih organa vrsta roda *Urtica* pokazali su se bolji u neutralizaciji NO radikala. Ekstrakti dobijeni različitim ekstrakcionim postupcima nisu ispoljili značajnije razlike u sposobnost neutralizacije ovog radikala.

OH test

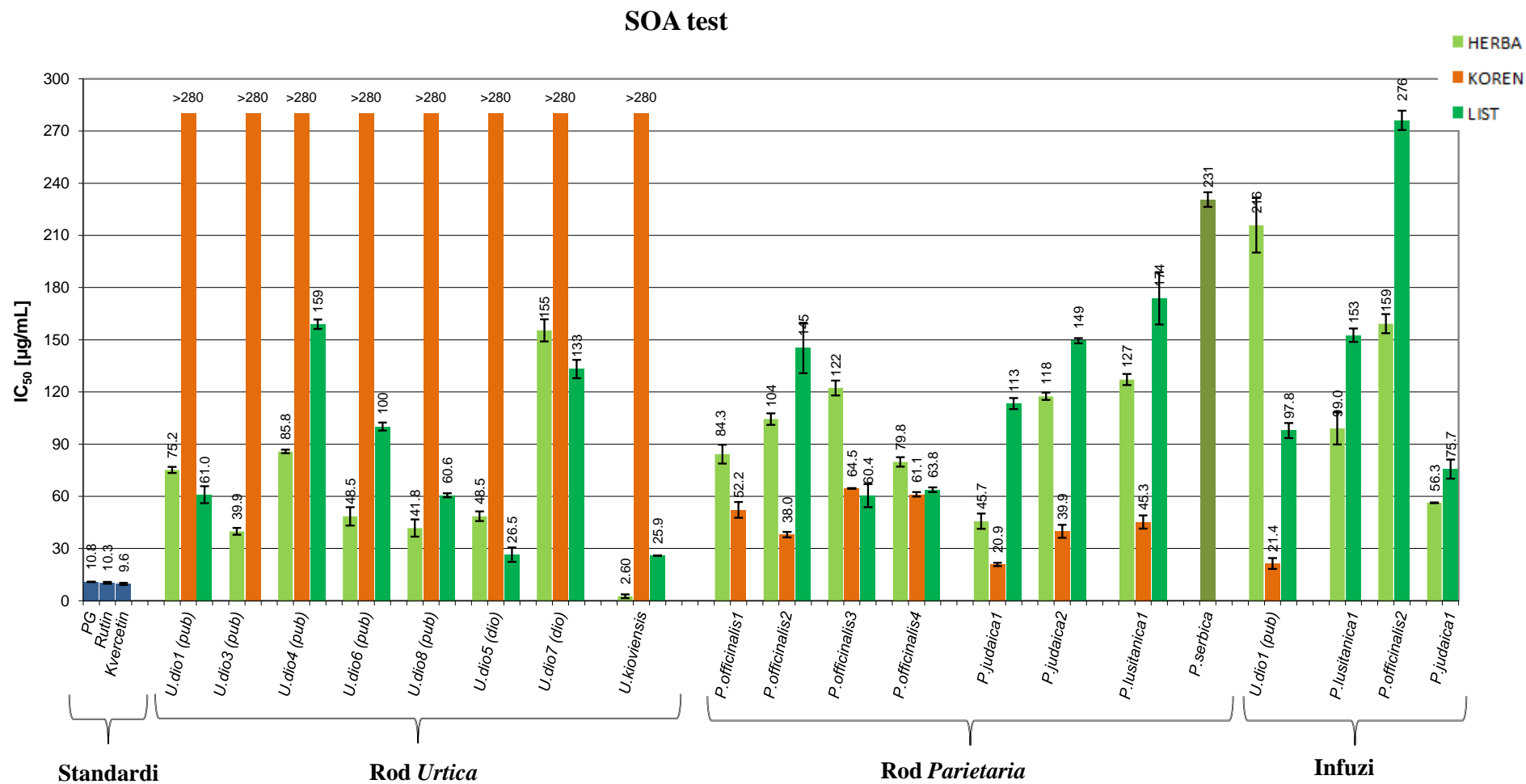
Hidroksil radikal je najreaktivnija samim tim i najštetnija radikalska vrsta u ćelijama. Ima izuzetno kratak poluživot jer odmah nakon njegovog generisanja teži da reaguje sa biomolekulima u okolini. U ovom radu određena je sposobnost ekstrakata da spreče Fe²⁺ posredovano nastajanje ·OH radikala kao i njegovu neutralizaciju. S obzirom da su ispitivani ekstrakti bogati flavonoidnim komponentama, očekuje se da mogu sprečiti nastanak ovog radikala heliranjem jona gvožđa. Na *Slici 4.41.* dat je uporedni prikaz IC₅₀ vrednosti za ekstrakte ispitivanih vrsta na osnovu kojih se može zaključiti da u ovom testu nema pravilne raspodele aktivnih komponenti između biljnih organa kod svih ispitivanih vrsta. Postoji velika varijacija u aktivnosti ekstrakata korena vrste *U. dioica* sa IC₅₀ vrednostima u opsegu 372 - 1532 µg/mL. Kod većine uzoraka ove vrste upravo je ekstrakt korena pokazao najmanju sposobnost neutralizacije ·OH radikala ali ovo pravilo nije u potpunosti ispraćeno (izuzetak - ekstrakt herbe *U. dio8 (pub)*). Slično je i sa različitim uzorcima vrste *P. officinalis* gde je kod uzorka *P. officinalis2* ekstrakt korena bio najaktivniji ali ne i kod preostala dva uzorka ove vrste. Sposobnost ekstrakata nadzemnih organa da neutrališe ·OH radikal ne varira u tolikoj meri kao aktivnost ekstrakata korena te nema značajnijih razlika u aktivnosti ekstrakata herbi i lista svih ispitivanih vrsta. Velike nedoslednosti u aktivnosti ekstrakata korena se mogu objasniti njihovom znatno lošijom rastvorljivošću u vodenoj sredini u kojoj se odigrava reakcija, odnosno, time što je korenje bogatije lipofilnim komponentama te da su hidrofilna jedinjenja nosioci aktivnosti u ovom testu. U prilog ovoj pretpostavci ide i to što su, za razliku od ostalih testova, u ovom testu infuzi ispoljili mnogo veću (od 2,7 do 9,3 puta veću) sposobnost neutralizacije ·OH radikala u odnosu na odgovarajuće metanolne ekstrakte.

Test inhibicije lipidne peroksidacije

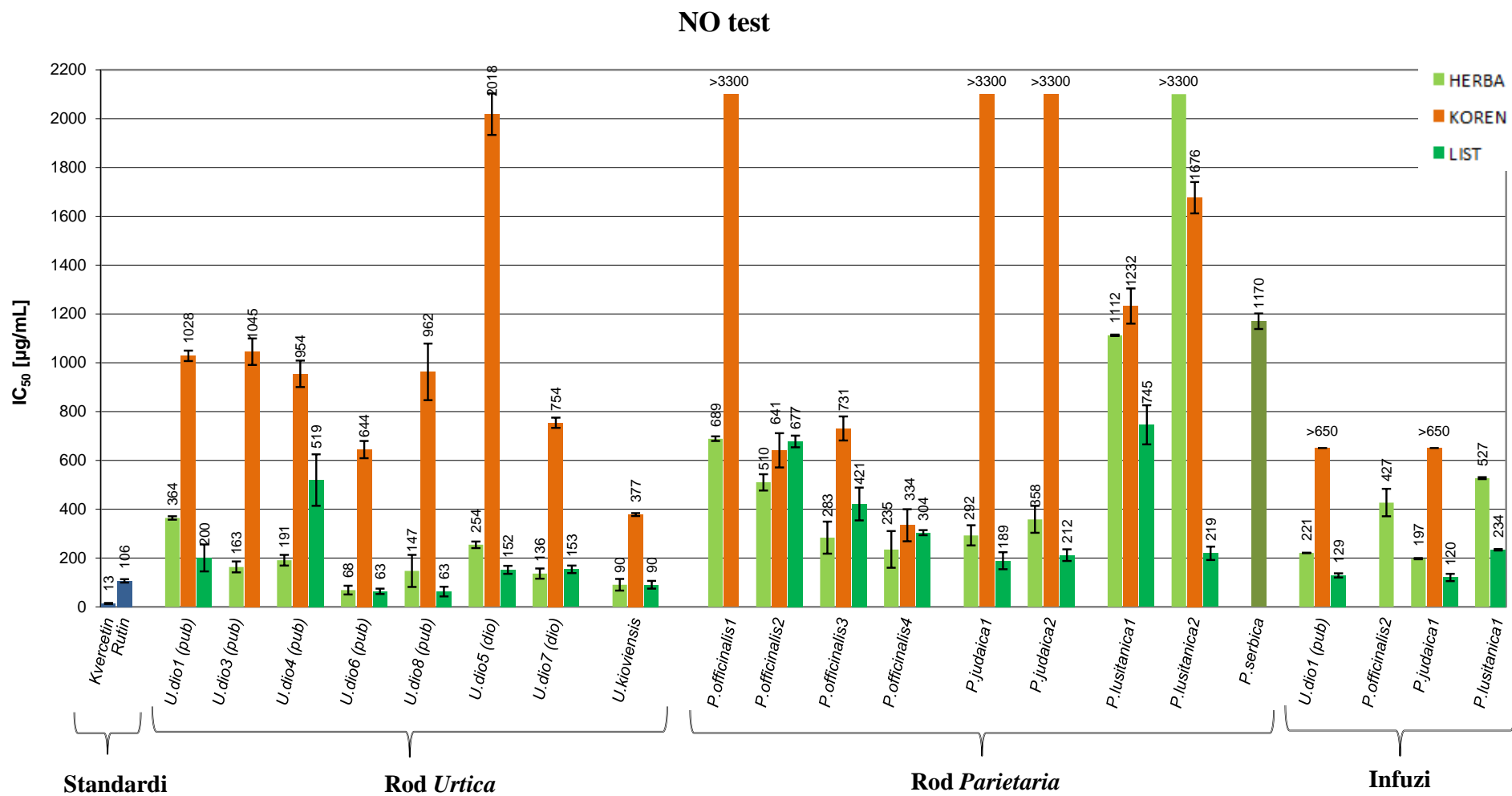
Lipidna peroksidacija (LP) je proces oksidativnog oštećenja lipida i ukoliko se odigrava na fosfolipidima ćelijske membrane može oštetiti njenu stururu i narušiti njenu permeabilnost. Sposobnost ekstrakata da inhibiraju ovaj proces ispitana je na lanenom ulju kao supstratu koji je bogat polinezasićenim masnim kiselinama (69,7 % linoleinske i 13,5 % linolne kiseline). Kao inicijator lančane reakcije primenjivan je Fe²⁺/askorbat sistem i određivana je količina nastalog malonildialdehida (MDA) kao jednog od krajnjih degradacionih produkata lipida u reakciji sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA). U ovom testu, slično kao u prethodnom, komponente ekstrakta mogu helatirati jone Fe²⁺ i sprečiti LP ili neutralisati nastale radikalske vrste. Koliko su u tome bile uspešne, prikazano je na histogramu (*Slika 4.42.*). Ekstrakti korena vrsta roda *Parietaria* su se pokazali kao najbolji inhibitori lipidne peroksidacije (izuzetak *P.lusitanica2* - koren) sa IC₅₀ vrednostima u opsegu 15 - 50 µg/mL. Suprotno tome, ekstrakti nadzemnih organa istih vrsta su bili znatno lošiji supresori ovog procesa. Ekstrakti herbi vrsta *P. lusitanica* i *P. serbica* nisu ni dostigli inhibiciju od 50% u ispitivanom opsegu koncentracija. Ekstrakti koprive su imali znatno više IC₅₀ vrednosti u odnosu na ekstrakte korena *Parietaria* vrsta i nije bilo moguće utvrditi koji ekstrakti (herbi, korena ili lista) najveću aktivnost. IC₅₀ vrednosti su se kretale u opsegu: za ekstrakte herbi 92 -238 mg/mL, korena 85 - 306 µg/mL i lista 103 - 306 µg/mL, te se ni jedan deo koprive ne može okarakterisati kao bolji inhibitor lipidne peroksidacije.



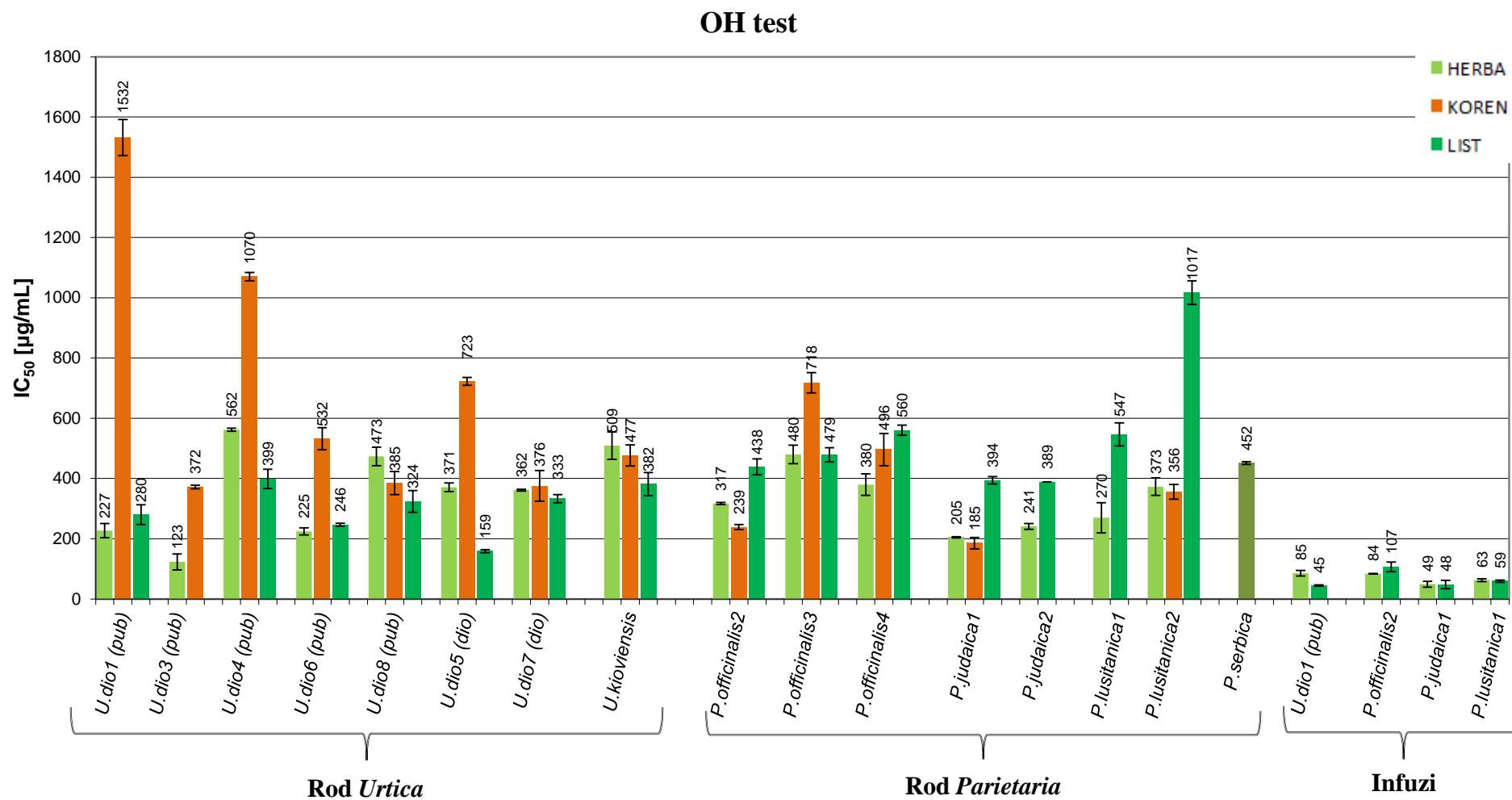
Slika 4.38. Poređenje antioksidantnog kapaciteta metanolnih ekstrakata i infuza, određenog DPPH testom



Slika 4.39. Poređenje antioksidantnog kapaciteta metanolnih ekstrakata i infuza, određenog SOA testom

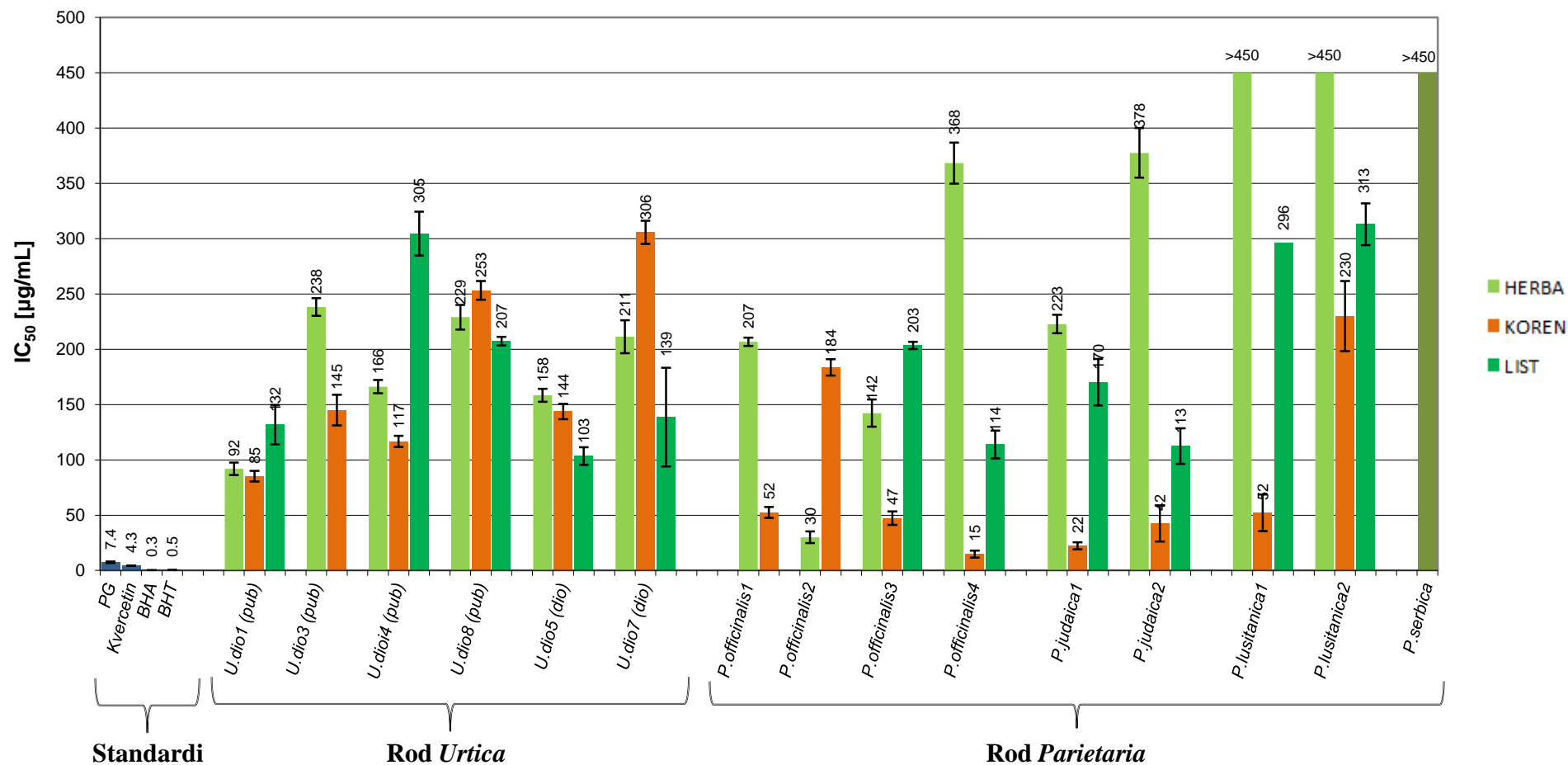


Slika 4.40. Poređenje antioksidantnog kapaciteta metanolnih ekstrakata i infuza, određenog NO testom

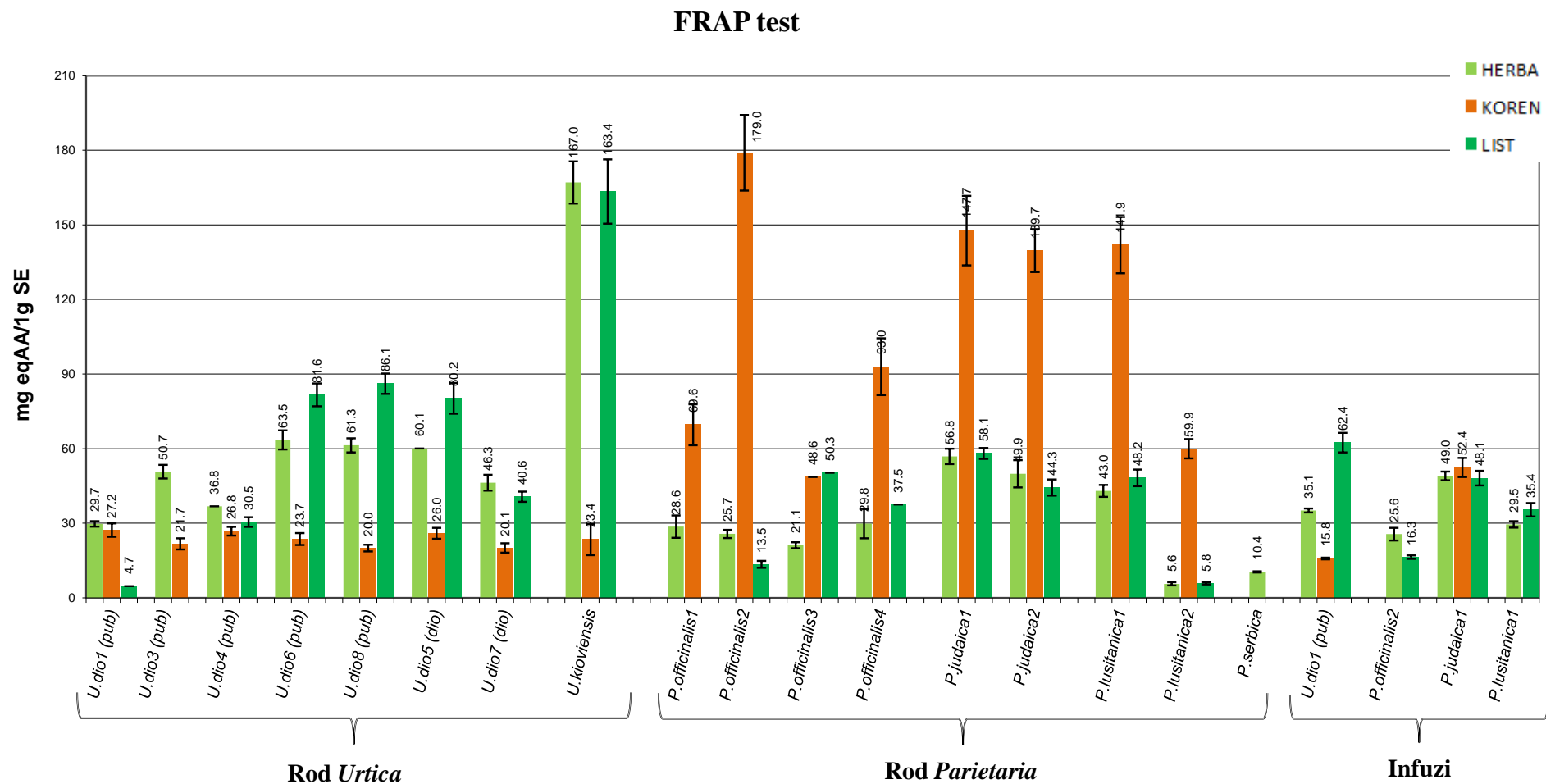


Slika 4.41. Poređenje antioksidantnog kapaciteta metanolnih ekstrakata i infuza, određenog OH testom.

Lipidna peroksidacija



Slika 4.42. Poređenje antioksidantnog kapaciteta metanolnih ekstrakata i infuza, određenog testom inhibicije lipidne peroksidacije.



Slika 4.43. Poređenje redukcionog kapaciteta metanolnih ekstrakata i infuza, određenog FRAP testom.

FRAP test

Redukciona sposobnost ekstrakata je ispitana redukcijom Fe²⁺-TPTZ kompleksa dok je kao referentni reducens primenjena askorbinska kiselina. Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenata askorbinske kiseline (AA) po 1g suvog ekstrakta (mg eqAA/1g SE) i predstavljeni na histogramu, *Slika 4.43*. Najveću redukcionu sposobnost su ispoljili ekstrakti korena vrsta iz roda *Parietaria* (*P. officinalis* 179,0 mg eqAA/1g SE) sa izraženom varijacijom između uzoraka sa različitih lokaliteta. Zatim se po redukcionalnoj sposobnosti istakla vrsta *U. kioviensis*, tačnije njeni ekstrakti herbe i lista sa 167,0 i 163,4 mg eqAA/1g SE. Kao najlošiji reducensi su se pokazali ekstrakti korena vrsta roda *Urtica*. Na osnovu ovoga se može zaključiti da su komponente ekstrakta koje imaju redukcione sposobnosti na isti način raspoređene kao i komponente aktivne u DPPH, SOA i NO testu. Infuz ekstrakta korena *P. judaica*1 ima znatno manju redukcionu sposobnost u poređenju sa metanolnim ekstraktom dok za ostale uzorke, promena načina ekstrakcije nije bitno uticala na redukcioni kapacitet.

Korelisanje dobijenih rezultata

U cilju korelacije određene antioksidantne aktivnosti ispitivanih ekstrakata i sadržaja fenolnih komponenti urađena je regresiona analiza. Dobijeni korelacioni faktori (Pearson-ovi koeficijenti) su predstavljeni u *Tabeli 4.16*. Određeni su stepeni korelacije između 6 antioksidantnih testova i ukupnih fenola i flavonoida, određenih spektrofotometrijski, kao i ukupnih fenolnih komponenti određenih LC-MS/MS metodom. Najviša korelacija je određena između rezultata DPPH i FRAP testa sa sadržajem ukupnih fenola - upravo u testovima gde se određuje sposobnost komponenti ekstrakta da doniraju atom vodonika ili elektron. Ovo je dodatna potvrda da se u testu određivanja ukupnih fenola sa FC reagensom zapravo određuje redukcioni kapacitet ekstrakta. Nešto manju korelaciju sa sadržajem ukupnih fenola su pokazali rezultati SOA i testa inhibicije lipidne peroksidacije. Visoka korelacija je određena između aktivnosti pri neutralizaciji NO radikala i određenih ukupnih flavonoida i ukupnih fenolnih komponenti određenih LC-MS/MS analizom a veoma salaba sa ukupnim fenolima određenih FC metodom. Ovo ukazuje da za neutralizaciju ovog radikala nisu zaslužne komponente sa visokom redukcionalnom aktivnošću. Korelisanjem rezultata neutralizacije OH radikala sa fenolnim sadržajem određenim u sva tri testa dobijeni su izuzetno niski koeficijenti te se može zaključiti da za neutralizaciju ovog radikala nisu zaslužne fenolne komponente. Relativno niska korelacija između određenih ukupnih flavonoida i antioksidantne aktivnosti ekstrakata može se objasniti time da u tom testu nisu vidljivi flavan-3-oli. Naime, u većini testova (DPPH, SOA, LP, FRAP) kao najbolji su se pokazali ekstrakti korena vrsta roda *Parietaria* koje karakteriše visok sadržaj epikatehina i katehina. Stoga je, većini slučajeva, određena bolja korelacija antioksidantne aktivnosti i fenolnih komponenti određenih LC-MS/MS analizom nego samih ukupnih flavonoida.

Tabela 4.16. Korelacioni faktori (Pearson-ovi koeficijenti) antioksidantne aktivnosti ispitivanih ekstrakata i sadržaja fenolnih komponenti.

Pearson-ovi koeficijenti (korelacioni faktori)	Spekrofotometrijske metode		LC-MS/MS
	Ukupni fenoli mg eqGA/1g SE	Ukupni flavonoidi mg eqQ/1g SE	Kvantitativna analiza mg fenola/1g SE
DPPH test (1/IC ₅₀)	0.9004	0.0065	0.2068
Inhibicija LP (1/IC ₅₀)	0.2088	0.0749	0.021
NO test (1/IC ₅₀)	0.0247	0.4683	0.3972
OH test (1/IC ₅₀)	0.0098	0.0118	0.0411
SOA test (1/IC ₅₀)	0.3648	0.0769	0.1458
FRAP test (mg eqAA/1g SE)	0.907	0.1441	0.2512

■ –faktor korelacije ~1 – visok stepen korelacije; ■ – srednja korelacija; ■ – niska korelacija.

Korelacioni faktori su određeni i između rezultata pojedinačnih antioksidantnih testova da bi se utvrdilo koji testovi imaju slične mehanizme delovanja. Naime, ranije je napomenuto da je zbog velike raznovrsnosti radikalskih vrsta potrebno imati i različite testove za procenu antioksidantnog potencijala. Svaki od testova daje različite informacije o antioksidantnom potencijalu ekstrakta. Dobijeni korelacioni faktori su dati u *Tabeli 4.17*. Najveća korelacija određena je između DPPH i FRAP testa ukazujući da se u oba testa određuje sposobnost komponenti ekstrakta da doniraju atom vodonika ili elektron. U dobroj korelaciji sa rezultatima ova dva testa su i dobijeni rezultati neutralizacije SOA radikala, ukazujući na sličan mehanizam i u ovom testu. Sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije takođe ispoljava dobru korelaciju sa sposobnošću neutralizacije DPPH i SOA radikala i redukcionim kapacitetom. Suprotno tome, sposobnost neutralizacije NO i OH radikala nije povezana sa redukcionim kapacitetom niti sposobnošću komponenti ekstrakta da doniraju atom vodonika.

Tabela 4.17. Korelacioni faktori antioksidantnih aktivnosti ispitivanih ekstrakata dobijenih primenom različitih testova.

Pearson-ovi koeficijenti (korelacioni faktori)		DPPH (1/IC ₅₀)	LP (1/IC ₅₀)	NO (1/IC ₅₀)	OH (1/IC ₅₀)	SOA (1/IC ₅₀)
FRAP	(mg eqAA/1g SE)	0.8794	0.1903	0.0865	2x10 ⁻⁵	0.3981
SOA	(1/IC ₅₀)	0.3363	0.1461	0.0267	0.0014	
OH	(1/IC ₅₀)	0.0042	0.0008	0.0268		
NO	(1/IC ₅₀)	0.0160	0.0296			
LP	(1/IC ₅₀)	0.2484				

■ –faktor korelacije ~1 – visok stepen korelacije; ■ – srednja korelacija; ■ – niska korelacija.

U većini testova za procenu antioksidantnog potencijala ispitivanih ekstrakata kao najbolji su se izdvojili metanolni ekstrakti korena vrsta roda *Parietaria*. Ovi ekstrakti su imali najniže IC₅₀ vrednosti u testovima neutralizacije DPPH i SOA radikala kao i inhibicije lipidne peroksidacije. Ispoljili su najveći redukcionni kapacitet određivan FRAP testom (ali i testom po Folin-Ciocalteu). Ono što ove ekstrakte izdvaja od ostalih jeste visok sadržaj flavan-3-ola: epikatehina i katehina. Ove komponente se smatraju glavnim aktivnim komponentama crnog čaja i dokazano je da ispoljavaju antioksidantnu aktivnost (Luczaj i Skrzydlewska, 2005). Stoga se može zaključiti da su nosioci antioksidantne aktivnosti ekstrakata korena vrsta roda *Parietaria* upravo ova jedinjenja.

Poređenjem aktivnosti vrsta roda *Urtica*, kao aktivnija pokazala se manje poznata vrsta *U. kioviensis*. Ekstrakti herbe i lista ove vrste bili su uspešniji u neutralizaciji DPPH, SOA i NO radikala, a imali su i veći redukcionni kapacitet. Analizom hemijskog sastava utvrđeno je da su samo u ovim ekstraktima prisutni C-glikozidi apigenina (viteksin), krizoeriola i luteolina. Pošto je šećerna komponenta kod C-glikozida vezana direktno za osnovni skelet flavonoida i na taj način ne maskira ni jednu OH grupu, ovi glikozidi imaju veći antioksidantni potencijal u odnosu na O-glikozide. Antioksidantno dejstvo viteksina je potvrđeno mnogim istraživanjima (Kim i sar, 2005; Prabhakar i sar, 1981; Fang i sar, 2012). Stoga se može zaključiti da su C-glikozidi zaslužni za viši antioksidantni potencijal ekstrakata herbe i lista vrste *U. kioviensis*. Poznato je da O-glikozidi imaju niži antioksidantni potencijal u odnosu na svoje aglikone, i da do najdrastičnijeg smanjenja u aktivnosti dolazi kada je šećerna komponenta vezana u položaju C-3. Pošto je u ekstraktima herbe i korena vrste *U. dioica*, rutin (kvercetin-3-O-rutinozid) dominantan flavonoidini glikozid bilo je očekivano da će ovi ekstrakti imati niži antioksidantni potencijal u odnosu na vrstu *U. kioviensis* u kojoj rutin nije identifikovan, a istovremeno je bogata C-glikozidima.

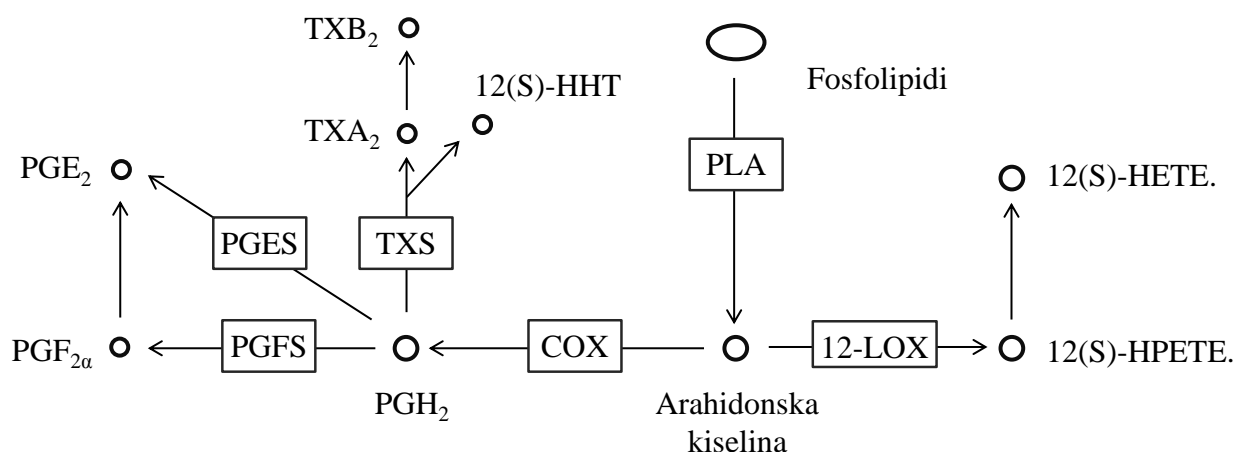
Zanimljivo je da su infuzi ili vodeni ekstrakti nadzemnih organa (herbe i lista) pokazali veoma sličnu ili malo manju antioksidantnu aktivnost u odnosu na metanolne ekstrakte istih vrsta. U testu neutralizacije OH radikala infuzi su bili čak 2,7 - 9,3 puta uspešniji u odnosu na odgovarajuće metanolne ekstrakte. Ovi rezultati su donekle iznenađujući jer je u ovim ekstraktima određen veoma nizak sadržaj

fenolnih jedinjenja LC-MS/MS metodom. To ukazuje da se ekstrakcijom sa vrelom vodom ekstrahuju i nefenolne komponente koje imaju antioksidantni potencijal kao na primer karotenoidi, vitamin C itd. Ipak, ovo je veoma pozitivan rezultat s obzirom da su infuzi pravljeni po klasičnoj recepturi za pravljenje čajnih napitaka. Stoga je, ovim rezultatima, opravdana vekovna upotreba čajeva od koprive ali i od biljnih vrsta iz roda *Parietaria*.

4.3. ANTIINFLAMATORNA AKTIVNOST EKSTRAKATA

Povećana produkcija eikozanoida smatra se jedinim od osnovnih obeležja inflamacije u organizmu i ova jedinjenja predstavljaju veoma važne medijatore inflamatornih procesa. Kao odgovor na proinflamatorne stimuluse, aktivira se enzim fosfolipaza A (PLA) koja oslobađa arahidonsku kiselinu iz fosfolipida ćelijske membrane. Daljim metaboličkim transformacijama, dejstvom enzima ciklooksigenaze (COX) i lipooksigenaze (LOX) iz ovog prekursora se proizvode brojni eikozanoidi.

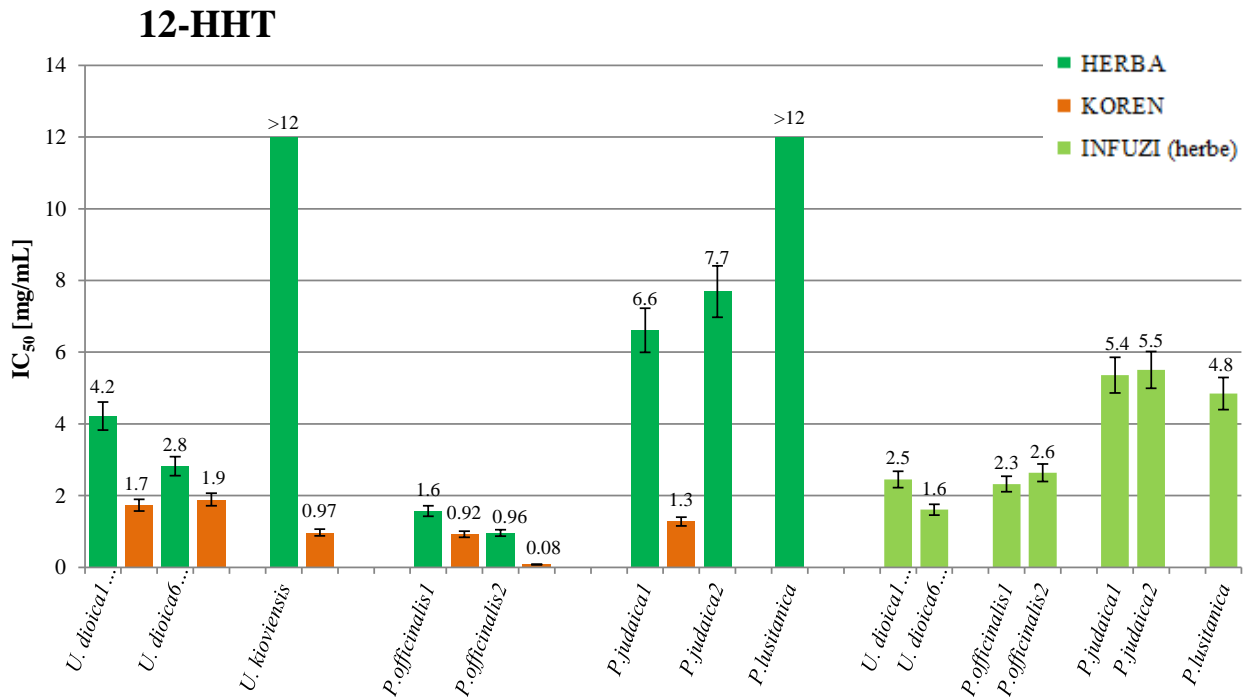
U ovom radu, kao model sistem odabrani su humani trombociti (*ex vivo*) koji sadrže enzime COX-1 i 12-LOX. Proces inflamacije u trombocitima je izazvan dodatkom Ca^{2+} jona i kalcijumove jonofore kalcimicina (A23184). Količina produkovanog metabolita je određena primenom LC-MS/MS tehnike koja je specifičnija i pouzdanija od različitih spektrofotometrijskih metoda (Beara i sar, 2010). U ovom radu praćen je uticaj ekstrakata na produkciju sledećih metabolita arahidonske kiseline (Slika 4.44.): 12-HETE je kvantifikovan kao produkt LOX metaboličkog puta dok su od produkata COX grane kvantifikovane količine 12-HHT, TXB_2 , PGE_2 i $\text{PGF}_{2\alpha}$. Praćenjem više metabolita COX grane, bilo je moguće utvrditi dejstvo komponenti ekstrakta i na druge enzime pored COX-1. Pre svega, kvantifikovanjem TXB_2 i 12-HHT metabolita određivan je uticaj na enzim tromboksan sintazu (TX sintazu) a kvantifikacijom PGE_2 i $\text{PGF}_{2\alpha}$ određeni su uticaji na enzime PGF sintazu (PGFS) i PGE sintazu (PGES). S obzirom da je u kontrolama količina određenog metabolita $\text{PGF}_{2\alpha}$ bila izuzetno niska, nije bilo moguće odrediti uticaj ekstrakata na njegovu produkciju. Rezultati su dati kao IC_{50} vrednosti, odnosno koncentracije ekstrakata potrebne da se produkcija metabolita smanji na 50% u odnosu na produkciju u kontroli (Prilog 8.7., Tabela 8.26.).



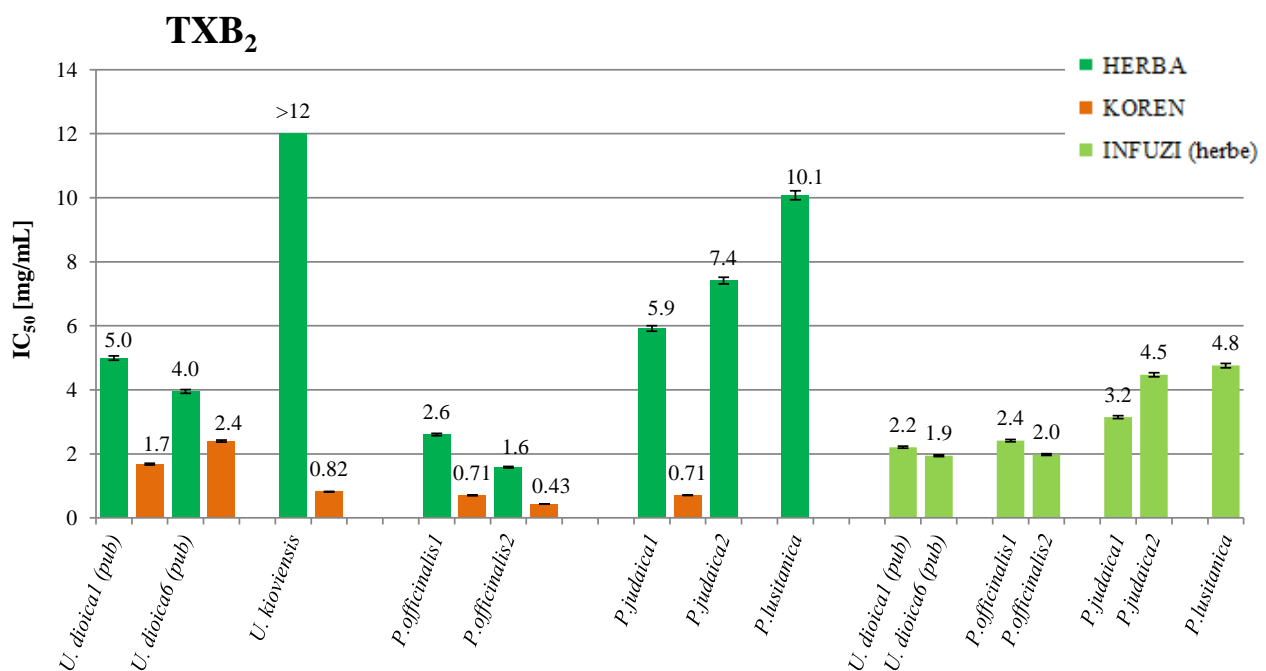
Slika 4.44. Šema metaboličkog puta arahidonske kiseline na kojoj su izdvojeni metaboliti i enzimi praćeni u ovom radu.

Na histogramima (Slike 4.45. i 4.46.) dat je uporedni prikaz IC_{50} vrednosti za metabolite 12-HHT i TXB_2 , sa kojih je evidentno slična sposobnost ekstrakta da smanjuju produkciju oba metabolita. Ovo je veoma očekivano s obzirom da su oba metabolita produkti jednog enzima - tromboksan sintaze. Kod svih ispitivanih vrsta, ekstrakti korena su imali bolju sposobnost inhibicije produkcije ova dva metabolita. Najbolju inhibiciju ispoljili su ekstrakti korena vrste *P. officinalis* sa IC_{50} vrednostima za 12-HHT 0,08 i

0,96 mg/mL i za TXB₂ 0,43 i 0,71 mg/mL a zatim slede ekstrakti korena vrsta *P. judaica* i *U. kioviensis*. Ekstrakti korena vrste *U. dioica* su imali nešto veće IC₅₀ vrednosti ali i pored toga su bili bolji inhibitori od ekstrakata odgovarajućih herbi. Od ekstrakata herbi ponovo su se kao najbolji pokazali ekstrakti vrste *P. officinalis* te možemo zaključiti da ova vrsta inhibira enzim tromboksan sintazu. Ekstrakti herbi vrsta *U. kioviensis* i *P. lusitanica* nisu uspeali da smanje produkciju ovih metabolita odnosno nema nikakav uticaj na enzim TX sintazu. Veoma je interesantno da su infuzi herbi bili bolji inhibitori produkcije ova dva metabolita u odnosu na metanolne ekstrakte.

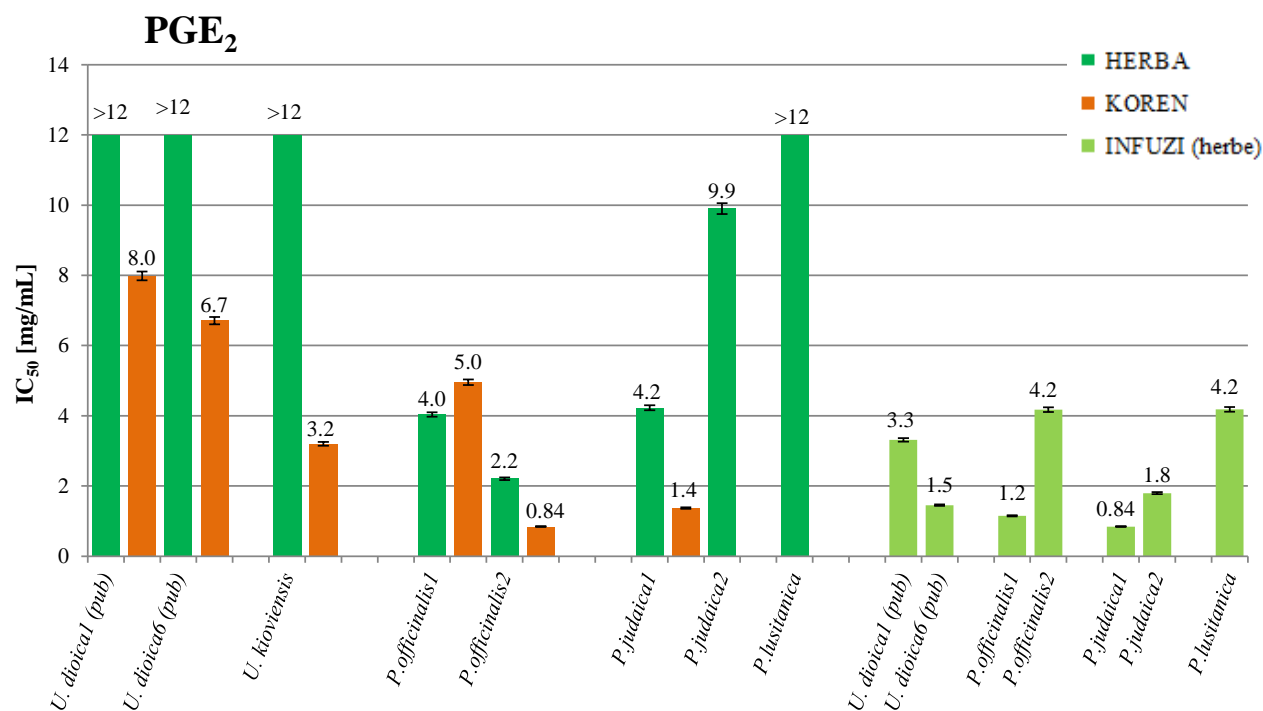


Slika 4.45. Poređenje sposobnosti ispitivanih ekstrakata da inhibiraju produkciju 12-HHT metabolita.

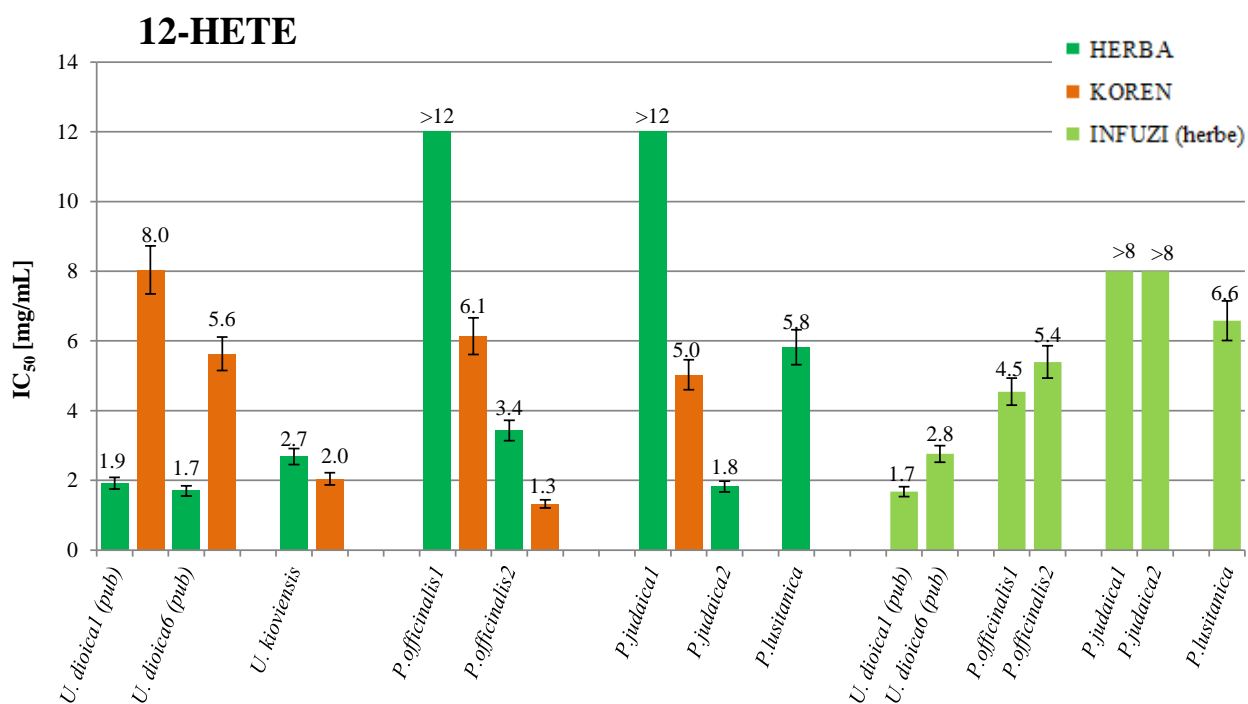


Slika 4.46. Poređenje sposobnosti ispitivanih ekstrakata da inhibiraju produkciju TXB₂ metabolita.

Kvantifikacijom metabolita PGE_2 je određivan uticaj komponenti ekstrakata na enzim PGE sintazu ili posredno na enzim PGF sintazu. Rezultati su predstavljeni na histogramu (Slika 4.47.). I u ovom slučaju, aktivniji su bili ekstrakti korena svih ispitivanih vrsta dok ekstrakti herbi čak tri vrste (*U. dioica*, *U. kioviensis* i *P. lusitanica*) nisu uspjeli da inhibiraju produkciju ovog metabolita za 50% u ispitivanom opsegu koncentracija. Najbolju inhibiciju je ispoljio ekstrakt korena uzorka *P. officinalis*2 (kao i za prethodne metabolite) sa IC_{50} vrednosti od 0,84 mg/mL. Međutim, ekstrakt korena iste vrste sa drugog lokaliteta je ispoljio znatno lošiju inhibiciju te bi za konačnu ocenu bilo potrebno analizirati još uzoraka



Slika 4.47. Poređenje sposobnosti ispitivanih ekstrakata da inhibiraju produkciju PGE_2 metabolita.



Slika 4.48. Poređenje sposobnosti ispitivanih ekstrakata da inhibiraju produkciju 12-HETE metabolita.

korena vrste *P. officinalis*. Ekstrakt korena vrste *P. judaica* je bio, takođe, veoma uspešan u inhibiciji enzima PGE sintaze. Slično kao kod enzima TX sintaze, i u ovom slučaju su infuzi herbi bili uspešniji inhibitori u odnosu na odgovarajuće metanolne ekstrakte. Naročito se ističu infuzi koprive i vrste *P. judaica* sa IC_{50} vrednostima u opsegu 0,84 - 3,30 mg/mL.

Uticaj komponenti ekstrakta na aktivnost enzima 12-LOX je praćen kvantifikacijom metabolita 12-HETE. Rezultati su prikazani na histogramu (Slika 4.48.). Ekstrakti herbe koprive su se pokazali kao najbolji inhibitori ovog metaboličkog puta ($IC_{50} = 1,7 - 1,9$ mg/mL), dok su ekstrakti korena iste vrste bili znatno lošiji. U slučaju ekstrakata vrsta iz roda *Parietaria* veoma je teško interpretirati dobijene rezultate jer postoji veoma velika razlika u aktivnosti ekstrakata istih vrsta sa različitim lokaliteta. Stoga bi bilo trebalo analizirati dodatne uzorke da bi se sa sigurnošću odredio njihov uticaj na LOX granu metaboličkog puta. Infuzi herbi koprive su pokazali takođe dobru inhibiciju produkcije 12-HETE metabolita, dok su infuzi ostalih vrsta ispoljili znatno nižu aktivnost.

Tabela 4.18. Upporedni prikaz IC_{50} vrednosti svih ispitivanih ekstrakata za sva četiri praćena metabolita i enzimi koje inhibiraju.

IC_{50} [mg/mL]	COX			LOX	Inhibirani enzim
	TX sintaza		PGES	12-HETE	
	12-HHT	TXB ₂	PGE ₂		
<i>U. dioica</i> 1 - herba	4.22	4.99	12	1.92	LOX, u manjoj meri TXS
<i>U. dioica</i> 1 - koren	1.73	1.68	7.98	8.04	TXS
<i>U. dioica</i> 6 - herba	2.82	3.95	12	1.70	12-LOX, TXS
<i>U. dioica</i> 6 - koren	1.89	2.40	6.71	5.63	TXS, u manjoj meri 12-LOX
<i>U. kioviensis</i> - herba	12	12	12	2.68	12-LOX
<i>U. kioviensis</i> - koren	0.97	0.82	3.2	2.04	TXS, manje 12-LOX i PGES
<i>P. officinalis</i> 1 - herba	1.57	2.60	4.04	12	COX-1
<i>P. officinalis</i> 1 - koren	0.92	0.71	4.95	6.14	TXS, u manjoj meri PGES
<i>P. officinalis</i> 2 - herba	0.96	1.58	2.21	3.43	COX-1, manje 12-LOX
<i>P. officinalis</i> 2 - koren	0.08	0.43	0.84	1.32	COX-1 i 12-LOX (PLA)
<i>P. judaica</i> 1 - herba	6.61	5.92	4.23	12	U manjoj meri PGES
<i>P. judaica</i> 1 - koren	1.28	0.71	1.37	5.03	COX-1, manje 12-LOX
<i>P. judaica</i> 2 - herba	7.69	7.41	9.9	1.82	12-LOX
<i>P. lusitanica</i> 1 - herba	12	10.1	12	5.82	U manjoj meri 12-LOX
Infuzi (vodeni ekstrakti)					
<i>U. dioica</i> 1 - herba	2.45	2.21	3.31	1.67	COX-1 i 12-LOX (PLA)
<i>U. dioica</i> 6 - herba	1.61	1.94	1.45	2.76	COX-1 i 12-LOX (PLA)
<i>P. officinalis</i> 1 - herba	2.32	2.41	1.15	4.54	COX-1, manje 12-LOX
<i>P. officinalis</i> 2 - herba	2.63	1.98	4.17	5.40	TXS, u manjoj meri PGES
<i>P. judaica</i> 1 - herba	5.36	3.15	0.84	8	PGES, u manjoj meri TXS
<i>P. judaica</i> 2 - herba	5.51	4.47	1.79	8	PGES, u manjoj meri TXS
<i>P. lusitanica</i> 1 - herba	4.85	4.76	4.18	6.58	U manjoj meri COX-1

■ – niske IC_{50} vrednosti; ■ – srednje IC_{50} vrednosti; ■ – visoke IC_{50} vrednosti.

Radi bolje preglednosti i lakšeg tumačenja uticaja ispitivanih ekstrakata na konkretne enzime (TX, PGE, 12-LOX, COX-1) dobijeni rezultati (IC_{50} vrednosti) su date u *Tabeli 4.18*. Kopriva (*U. dioica*) ima dugu primenu protiv upalnih procesa u tradicionalnoj medicini i takvo dejstvo je potvrđeno i modernim istraživanjima. Prema rezultatima Obertreis-a i saradnika (1996a) preparat koprive (IDS23) smanjuje COX-zavisnu (i samo delimično LOX-zavisnu) produkciju prostaglandina (PGD_2 i PGF_2). Međutim, u ovom radu su se dobili gotovo suprotni rezultati. Metanolni ekstrakti herbe koprive su u najvećoj meri smanjili upravo LOX-zavisnu produkciju metabolita 12-HETE, dok su bili mnogo slabiji inhibitori COX metaboličkog puta (slaba inhibicija TX sintaze i zanemarljiv uticaj na PGE sintazu). Kao mnogo bolji inhibitori enzima TX sintaze su se pokazali ekstrakti korena koprive. Infuzi herbe koprive pripremljeni po recepturi za čajeve su znatno smanjili produkciju sva četiri praćena metabolita. Ovi rezultati ukazuju da je došlo do inhibicije oba enzima (COX-1 i 12-LOX) ali možda čak i inicijalnog enzima ovog metaboličkog puta - fosfolipaze A. Na ovaj način je, još jednom, opravdana dugogodišnja upotreba čajeva od koprive u terapiji upalnih procesa. Što se tiče vrste *U. kioviensis*, njen ekstrakt herbe nije uticao na COX metabolički put ali jeste znatno smanjio produkciju 12-HETE metabolita LOX grane. Ipak, mnogo aktivniji se pokazao ekstrakt korena ove vrste koji je veoma dobro inhibirao enzim TX sintazu a nešto slabije i PGE sintazu kao i 12-LOX enzim.

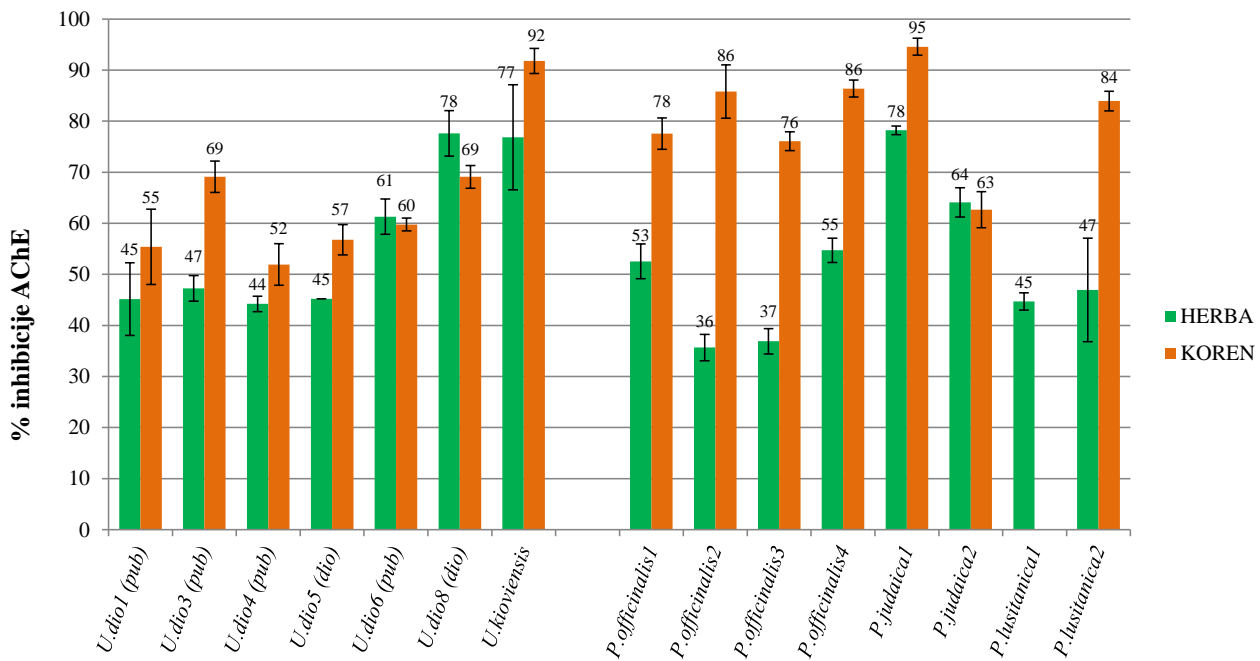
Ekstrakti korena vrsta roda *Parietaria* su se pokazali kao veoma dobri inhibitori TX sintaze i u manjoj meri PGE sintaze. Svi ekstrakti korena vrsta roda *Parietaria* imaju veoma visok sadržaj katehina i epikatehina za koje je utvrđeno da su dobri inhibitori enzima tromboksan sintaze (Vibes i sar, 1994). Stoga se sposobnost ovih ekstrakata da inhibiraju TX sintazu može pripisati visokom sadržaju flavan-3-ola. Kao najaktivniji ekstrakt se istakao ekstrakt korena *P. officinalis* sa IC_{50} vrednostima za enzime COX grane u osegu 0,08 - 0,84 mg/mL a za 12-LOX 1,32 mg/mL. Stoga se može zaključiti da je ovaj ekstrakt doveo do inhibicije i samog enzima fosfolipaze A. Ipak, veoma velike razlike postoje između ekstrakata iste vrste sa različitih lokaliteta što otežava nedvosmisleno tumačenje rezultata. Metanolni ekstrakti herbi vrsta *P. judaica* i *P. lusitanica* nisu ispoljili značajnu inhibiciju metaboličkog puta arahidnoske kiseline ali njihovi infuzi su ispoljili nešto bolju inhibiciju COX puta, naročito infuzi vrste *P. judaica* u inhibiciji PGE sintaze.

4.4. INHIBICIJA ENZIMA ACETILHOLINESTERAZE

Smanjena holinergična neurotransmisija je povezana sa nastankom nekoliko neurodegenerativnih bolesti. Među njima, najčešći oblik demencije je Alchajmerova bolest (AD) od koje pati sve više starijih osoba. Moderni pristup tretmanu raznih vrsta demencija jeste primena inhibitora enzima holinesteraza te je intenzivirana potraga za odgovarajućim inhibitorima. Postoje brojni sintetski i semisintetski inhibitori koji se koriste u terapiji AD-a dok se od prirodnih proizvoda najčešće primenjuju alkaloidi od kojih je najpoznatiji galantamin kao veoma snažan kompetitivni inhibitor enzima acetilholinesteraze (AChE). Međutim, sama Alchajmerova bolest je kompleksno obolenje koje podrazumeva različite upalne procese povezane sa povećanom produkcijom reaktivnih kiseoničnih vrsta te se pojavljuje novi terapijski pristup baziran na komponentama sa antioksidantnim i antiinflamatornim svojstvima (Loizzo i sar, 2008).

S obzirom da su ekstrakti vrsta iz rodova *Urtica* i *Parietaria* pokazali dobru sposobnost neutralizacije različitih radikalskih vrsta kao i inhibicije enzima metaboličkog puta arahidonske kiseline, bilo je korisno ispitati i njihov uticaj na enzim acetilholinesterazu. Uticaj ekstrakata na acetilholinesterazu je određen po metodi sa Ellmanovim reagensom i rezultati su predstavljeni na histogramu (*Slika 4.49*. i u *Prilogu 8.8.*, *Tabela 8.27.*) kao procenat inhibicije enzima AChE pri koncentraciji ekstrakta od 1 mg/mL. Kao bolji inhibitori ovog enzima kod svih ispitivanih vrsta su se pokazali ekstrakti korena u odnosu na ekstrakte herbi. Ekstrakti korena svih vrsta roda *Parietaria* su postigli izuzetno visoku inhibiciju (opseg: 77 - 95 %) dok se iz roda *Urtica* po sposobnosti inhibicije ovog enzima istakao ekstrakt korena vrste *U.*

kioviensis (92 %). Kao poznati inhibitor AChE korišćen je galantamin koji je pri koncentraciji od 1 mg/ml potpuno inhibirao ovaj enzim.



Slika 4.49. Sposobnost metanolnih ekstrakata da inhibiraju enzim AChE pri koncentraciji od 1 mg/mL.

Do sada je testiran veoma veliki broj prirodnih jedinjenja kao potencijalnih inhibitora acetilholinesteraze, od kojih je najveći deo pripadao alkaloidima (Williams i sar, 2011). Međutim, ove komponente su ispoljile veoma ozbiljne sporedne efekte kao što su smetnje u gastrointestinalnom traktu i hepatotoksičnost. Primer za to je takrin koji je bio prvi licenciran AChE inhibitor a sada je njegova upotreba stopirana zbog štetnog dejstva na jetru (Hammel i sar, 1990; Watkins i sar, 1994). Ovaj inhibitor je zamenjen drugim alkaloidnim komponentama kao što su donepezil, rivastigmin i galantamin (poglavlje 2.3.2.). Ipak, novija istraživanja pogodnijih inhibitora AChE se sve više baziraju na nealkaloidnim komponentama naročito flavonoidima, koji imaju širok spektar bioloških aktivnosti. Glavne prednosti flavonoida kao inhibitora AChE u odnosu na alkaloidne jeste njihova izuzetna antioksidantna aktivnost i niska toksičnost (Ji i Zhgang, 2006). Iako je do sada ispitana inhibitorna sposobnost preko 150 flavonoida prema ovom enzimu, ne postoje literaturni podaci o uticaju flavan-3-ola na ovaj enzim (Uriarte-Pueyo i Calvo, 2011). Pošto su katehin i epikatehin dominantne komponente ekstrakata korena vrsta roda *Parietaria* bilo bi interesantno ispitati da li su upravo ove komponente nosioci inhibitorne aktivnosti ekstrakata. Dominantan flavonoid u ekstraktima herbi vrste *U. dioica* - rutin - nema visoku inhibitornu aktivnost prema ovom enzimu te se time može opravdati relativno niska inhibicija AChE od strane ovih ekstrakata. Ipak, treba imati u vidu da su ekstrakti izuzetno složene smeše te je veoma teško pripisati njegovu aktivnost jednoj određenoj komponenti. Kao potencijalni inhibitori su testirane brojne prirodne smeše kao što su etrska ulja i ekstrakti ukazujući na bolji inhibitorni potencijal u odnosu na čiste komponente (Adsersen i sar, 2006; Orhan i sar, 2004; Orhan i sar, 2008). Evidentno je da su ekstrakti ispitivani u ovom radu, pored antioksidantnog i antiinflamatornog dejstva, ispoljili i visok stepen inhibicije enzima acetilholinesteraze te ih ovo čini veoma interesantnim za dalja istraživanja i primenu u terapijama različitih oblika demencija.

4.5. UTICAJ EKSTRAKATA NA IMUNI ODGOVOR I PROLIFERACIJU INTESTINALNIH EPITELNIH ČELIJA IEC18 I Caco2

Gastrointestinalni trakt (GIT) je organ koji je, pored kože, najviše u kontaktu sa spoljašnjom sredinom. Svakodnevno, unošenjem hrane i pića, GIT je izložen brojnim supstancama koje treba procesuirati za dalju absorpciju. Među unetim supstancama brojne su i štetne komponente tj. patogeni, te GIT predstavlja prvu liniju odbrane organizma. Dodatno, mukoza intestinalnog trakta je izložena i mikroorganizmima koji čine normalnu crevnu floru. Stoga, gastrointestinalni trakt, naročito epitelne ćelije, imaju veoma kompleksnu ulogu u raspoznavanju "domaćih", neštetnih mikroorganizama od stranih i modifikaciji imunog odgovora u skladu sa tim. Ukoliko je imunomodulatorna funkcija epitelnih ćelija poremećena dolazi do razvoja upalnih bolesti creva (eng. *IBD-inflammatory bowel disease*) kao što su Kronova bolest i ulcerozni kolitis. Posebna pažnja se posvećuje ovim dvema upalnim bolestima intestinuma jer sama patologija bolesti nije dobro definisana a i postojeće terapije nisu zadovoljavajuće. Terapije se zasnivaju na različitim imunomodulatornim lekovima kao što su kortikosteroidi i aminosalicilati koji imaju brojna neželjena dejstva i nisu delotvorni kod svih pacijenata (Lopez-Posadas i sar, 2010).

Biljke koje pripadaju rodovima *Urtica* i *Parietaria* su oduvek koristile kao zeljasto povrće u ishrani u obliku supa, pita zaljanica, čajeva (Kavalali, 2003; Upton, 2013). Stoga je bilo opravdano ispitati kakav uticaj mogu imati komponente ovih biljnih vrsta na imuni odgovor epitelnih ćelija GIT-a. Ranije je dokazano blagotvorno dejstvo vodenih ekstrakata koprive na proces varenja hrane tako što je pojačavao lučenja želudačnog i pankreasnog soka (Dobreff i sar, 1924). Takođe, vodeni ekstrakt koprive je ispoljio protektivno dejstvo na gastričnu mukoza smanjujući njeno oštećenje izazvano etanolom (Gulcin i sar, 2004).

U ovom radu ispitan je imunomodulatorni uticaj sedam metanolnih ekstrakata: *U. dioica* - herba i koren (*U. dio1 (pub)*), *P. officinalis* - herba i koren (*P. officinalis2*), *P. judaica* - herba i koren (*P. judaica1*) i *P. lusitanica* - herba (*P. lusitanica1*). Kao model sistemi epitela gastrointestinalnog trakta korišćene su ćelijske linije IEC18 (intestinalne epitelne ćelije pacova) i Caco2 (humane ćelije kolonorektalnog adenokarcinoma). Određen je uticaj ekstrakata na produkciju citokina (rat MCP1, GRO α , IL-8 i humani MCP1) u bazalnim uslovima i u uslovima LPS-indukovane inflamacije kao i signalni putevi preko kojih ekstrakti deluju. Ispitan je i uticaj ekstrakata na ekspresiju COX-2 u uslovima inflamacije izazvane LPS-om. Proliferativni efekat ekstrakta herbe i korena vrste *P. officinalis* je ispitan u eksperimentu epitelizacije "rane" IEC18 ćelija. Uticaj ova dva ekstrakta na diferencijaciju Caco2 ćelija je ispitan određivanjem nivoa ekspresije proteina PCNA i vilina.

Tabela 4.19. Aktivnost LDH [U/L] iz IEC18 ćelija nakon 24h inkubacije sa metanolnim ekstraktima.

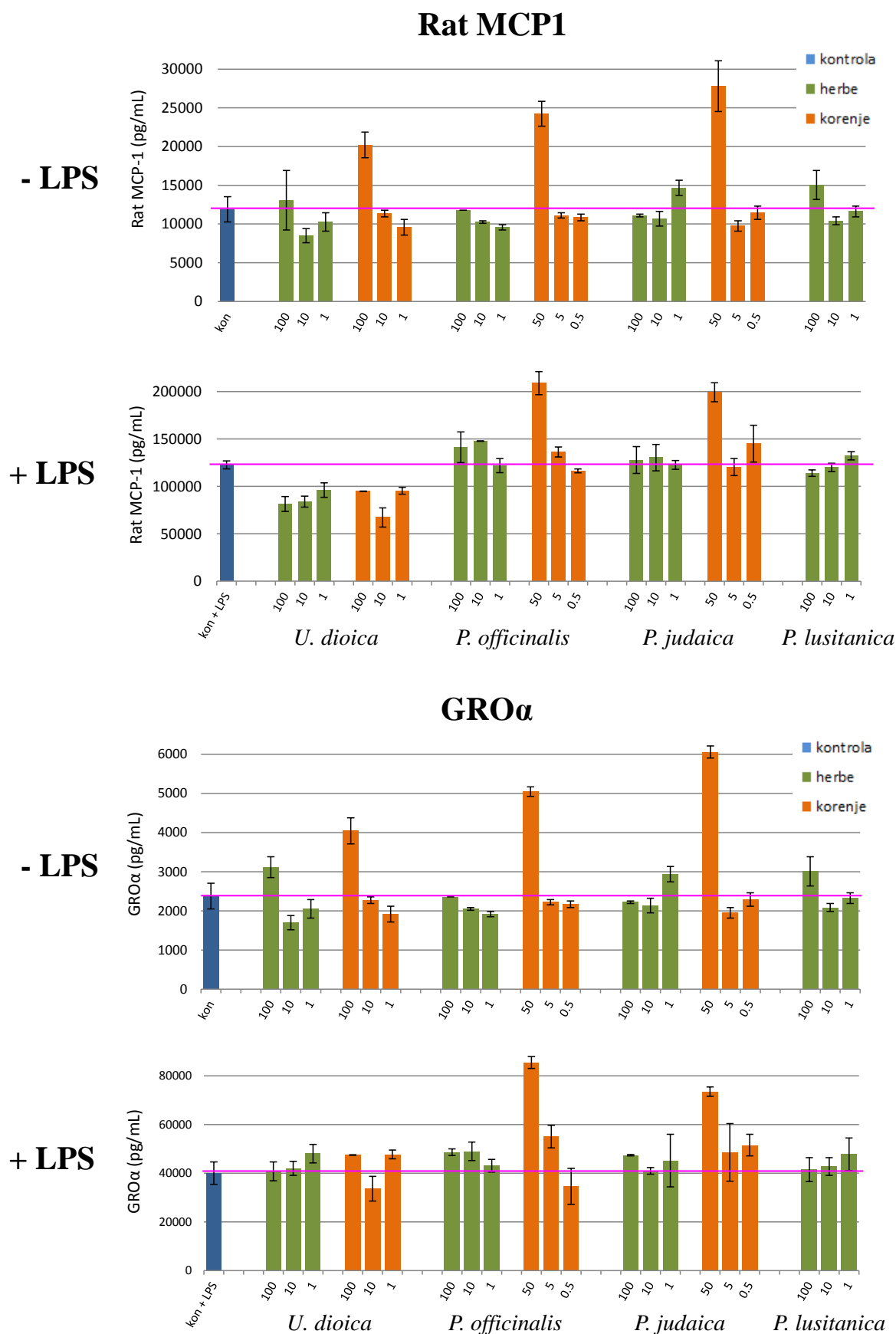
Aktivnost LDH [U/L]	<i>Urtica dioica</i>		<i>Parietaria officinalis</i>		<i>Parietaria judaica</i>		<i>P. lusitanica</i>
	herba	koren	herba	koren	herba	koren	herba
Kontrola	142.5	142.5	142.5	142.5	142.5	142.5	142.5
Kon-DMSO	151.2	151.2	151.2	151.2	151.2	151.2	151.2
0,1 μ g/ml	129.2	146.8	107.8	104.6	133.3	129.1	178.6
1 μ g/ml	153.3	139.1	175.9	149.1	160.5	174.8	140.9
10 μ g/ml	175.6	167.1	144.2	174.7	160.9	152.7	167.4
50 μ g/ml	186.1	181.8	170.1	201.5	188.5	185.6	178.0
100 μ g/ml	197.6	151.3	144.8	222.7	148.6	156.2	160.9
200 μ g/ml	155.9	107.8	142.4	312.4	140.9	220.6	169.7

Preliminarna ispitivanja toksičnosti ekstrakata na IEC18 ćelije su urađena sa ciljem da se odaberu netoksične koncentracije za rad u daljnim eksperimentima. Ukoliko ekstrakti ispoljavaju toksični efekat na ćelije, dolazi do narušavanja strukture ćelijske membrane i otpuštanja enzima laktat dehidrogenaze (LDH) u ekstracelularni prostor. Merenjem aktivnosti LDH u ćelijskom medijumu nakon inkubacije od 24h sa ekstraktima različitih koncentracija može se odrediti njihova toksičnost. Aktivnosti enzima laktat dehidrogenaze (LDH) pri različitim koncentracijama ispitivanih ekstrakata su dati u *Tabeli 4.19. (Prilog 8.9.1., Tabela 8.29.)*. Povećana aktivnost LDH je registrovana samo pri najvećim radnim koncentracijama (200 µg/ml) ekstrakata korenja vrsta iz roda *Parietaria*. U skladu sa dobijenim rezultatima, za rad su odabrane koncentracije od 100 µg/mL i manje a za ekstrakte korena *Parietaria* vrsta od 50 µg/mL i manje.

4.5.1. Uticaj ekstrakata na sekreciju proinflamatornih citokina (rat MCP1 i GRO α) iz IEC18 ćelija

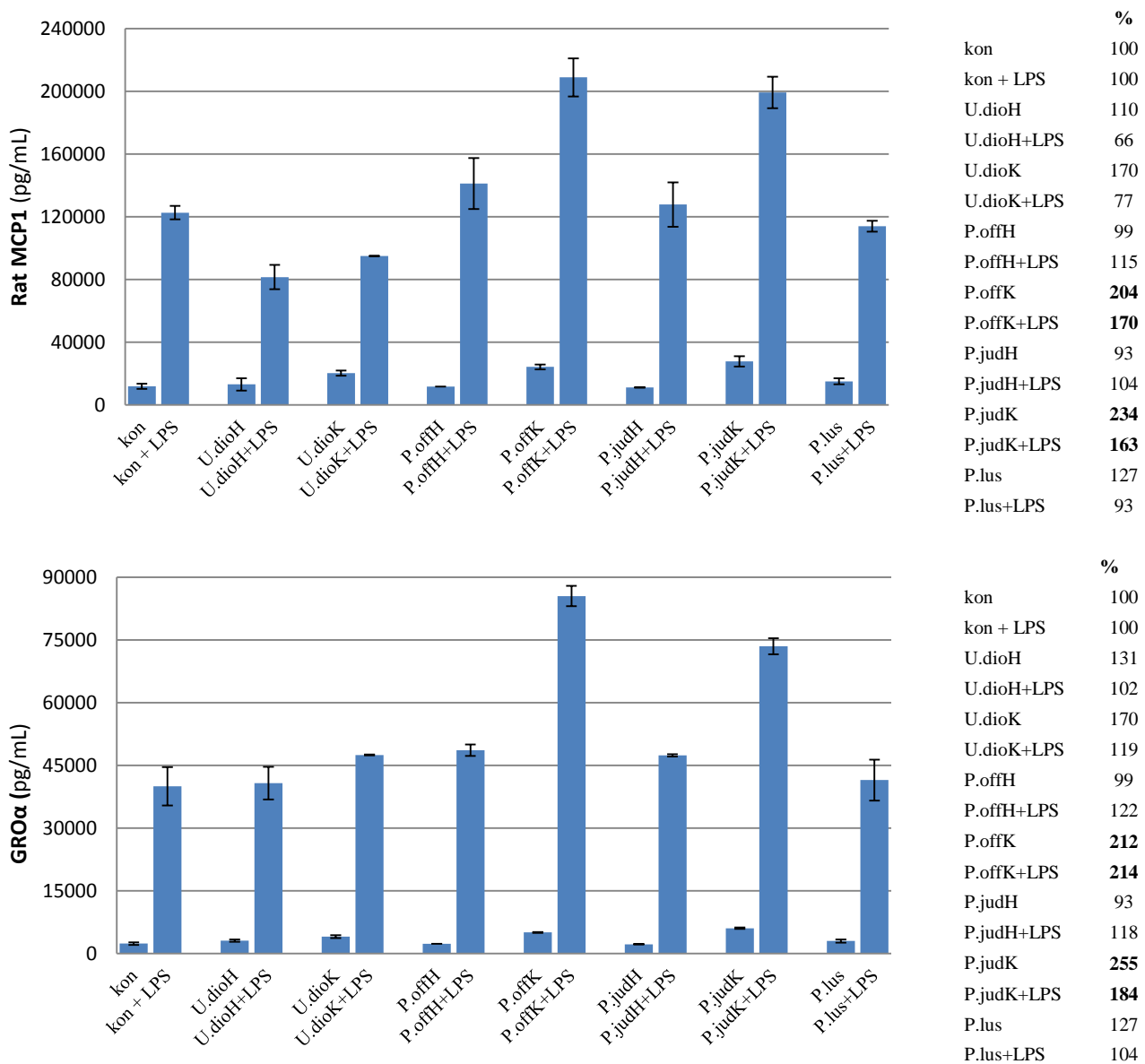
Monosloj intestinalnih epitelnih ćelija je esencijalan u inuom sistemu gastrointestinalnog trakta. Ove ćelije ekspresuju receptore koji prepoznaju antigene dospele u lumen GIT-a. Među njima su i Toll-like receptori - TLR kao receptori koji prepoznaju molekulske obrasce patogena, npr. TLR4 prepoznaje lipopolisaharide bakterijskog ćelijskog zida a TLR5 protein flagelin koji gradi bakterijske flagele (Lavelle i sar, 2010). Ovo ukazuje na njihovu protektivnu ulogu u odbrani organizma. Dodatno, miševi koji ne ekspresuju ove receptore su jako podložni razvoju kolitisa (Fukata i sar, 2005; Vijay-Kumar i sar, 2007). U prilog tome ide i činjenica da nedostatak MyD88, adapternog proteina većine TLR-ova, povećava šanse za razvoj kolitisa (Rakoff-Nahoum i sar, 2004). Aktivacija većine TLR-ova rezultuje aktivacijom NF- κ B signalinga što dovodi do povećane produkcije proinflamatornih citokina kao što su MCP1 i GRO α . Glavna uloga ovih hemokina jeste mobilizacija leukocita na mesto inflamacije i to GRO α privlači neutrofile a MCP1 monocite ali i T-limfocite, dendritske i NK ćelije. Iako je konstantna aktivacija NF- κ B dovoljna da se razvije inflamacija i dođe do oštećenja tkiva, ipak, aktivacija ovog faktora ima i pozitivne efekte. Pod tim efektima se podrazumeva zarastanje epitela, održavanje njegovog integriteta i promovisanje ćelijskog preživljavanja stimulacijom ekspresije antiapoptotičkih proteina (Karin i Lin, 2002; Pasparakis, 2009). Važna uloga NF- κ B faktora u imunom odgovoru GIT-a je dokazana kod miševa kod kojih aktivacija ovog faktora nije bila moguća i kao rezultat došlo je do jake inflamacije kolona (Nenci i sar, 2007). Zbog toga se smatra da je blaga stimulacija TLR i NF- κ B sistema i u bazalnim uslovima veoma korisna jer podiže spremnost GIT-a da se suoči sa patogenima koji svakodnevno dospevaju u organizam zajedno sa hranom i pićem.

U ovom radu prvo je određen uticaj odabranih metanolnih ekstrakata na sekreciju hemokina rat MCP1 i GRO α , u bazalnim uslovima (-LPS) i uslovima LPS-indukovane inflamacije (+LPS) i rezultati su predstavljeni na histogramima (*Slika 4.50. i u Prilogu 8.9.2., Tabele 8.30. – 8.32.*). Svi ekstrakti su dodati u tri radne koncentracije (vrednosti date na X-osi u µg/mL). Najizraženiji prosekretorni efekat za oba citokina ispoljili su ekstrakti korena vrsta roda *Parietaria* i to u uslovima sa i bez inflamacije. Ekstrakti herbe i korena vrste *U. dioica* i herbe vrste *P. lusitanica* su povećali produkciju oba citokina ali tek pri najvećoj koncentraciji i to samo u bazalnim uslovima. Oba ekstrakta vrste *U. dioica* su u uslovima inflamacije smanjili sekreciju rat MCP1 dok nisu menjali sekreciju GRO α . Ekstrakti herbi vrsta *P. officinalis* i *P. judaica* nisu značajno menjali sekreciju ni jednog citokina (vrednosti veoma bliske kontroli) ni u bazalnim ni u uslovima inflamacije te su izostavljeni iz daljih eksperimenata.



Slika 4.50. Uticaj odabranih metanolnih ekstrakata na sekreciju rat MCP1 (gore) i GRO α (dole) u bazalnim uslovima (-LPS) i u uslovima LPS-om izazvane inflamacije (+LPS). Kontrola (plavi stubić) predstavlja referenti nivo sekrecije i u odnosu na nju se posmatra da li ekstrakti stimulišu ili inhibiraju sekreciju datog citokina (ljubičasta linija). Svaki ekstrakt je rađen u tri radne koncentracije (vrednosti date na X-osi u $\mu\text{g/mL}$).

Interakcija LPS-a i komponenti ekstrakata pri produkciji ova dva citokina, se može jasnije uočiti na histogramima sa *Slike 4.51*. Na njima su predstavljeni rezultati sekrecije oba citokina, sa i bez LPS-a, samo pri najvišim radnim koncentracijama ekstrakata (50 µg/mL za ekstrakte korena vrsta roda *Parietaria* a za ostale 100 µg/mL) izvučeni iz histograma sa *Slike 4.50*. U tabelama pored histograma dat je procenat sekrecije citokina u odnosu na odgovarajuću kontrolu. Iz datih rezultata jasno se uočava sinergistički efekat LPS-a i ekstrakata korena vrsta roda *Parietaria* sa povećanjem sekrecije znatno iznad sume individualnih efekata (više od 200 % u odnosu na sam LPS). Suprotno tome, ekstrakti herbe i korena vrste *U. dioica* smanjuju LPS-om indukovanu sekreciju rat MCP1 citokina, i to na 66% (herba) odnosno na 77% (koren) u odnosu na sam LPS (100%). Ovo je u skladu sa prethodno dobijenim rezultatima Obertreis i saradnika (1996b) prema kojima metanolni ekstrakt herbe *U. dioica* smanjuje LPS-om indukovanu produkciju proinflammatoryh citokina TNF α i IL-1 β . Prema tome, ekstrakt herbe koprive u bazalnim uslovima blago stimuliše sekreciju rat MCP1 i GRO α (110 i 131 % u odnosu na odg. kontrolu) a u uslovima inflamacije izazvane bakterijskim lipopolisaharidima tu sekreciju smanjuje. Ovakvo dejstvo čini ga veoma pogodnim da povećava steady-state odbranu organizma u gastrointestinalnom traktu a sa druge strane, sprečava prekomernu produkciju proinflammatoryh agenasa i oštećenja koja mogu nastati kao posledica hroničnih inflamacija.



Slika 4.51. Interakcija ekstrakata sa LPS-om pri sekreciji proinflammatoryh citokina rat MCP1 (gore) i GRO α (dole).

4.5.1.1. Uticaj ekstrakata na signalne puteve u produkciji rat MCP1 i GRO α

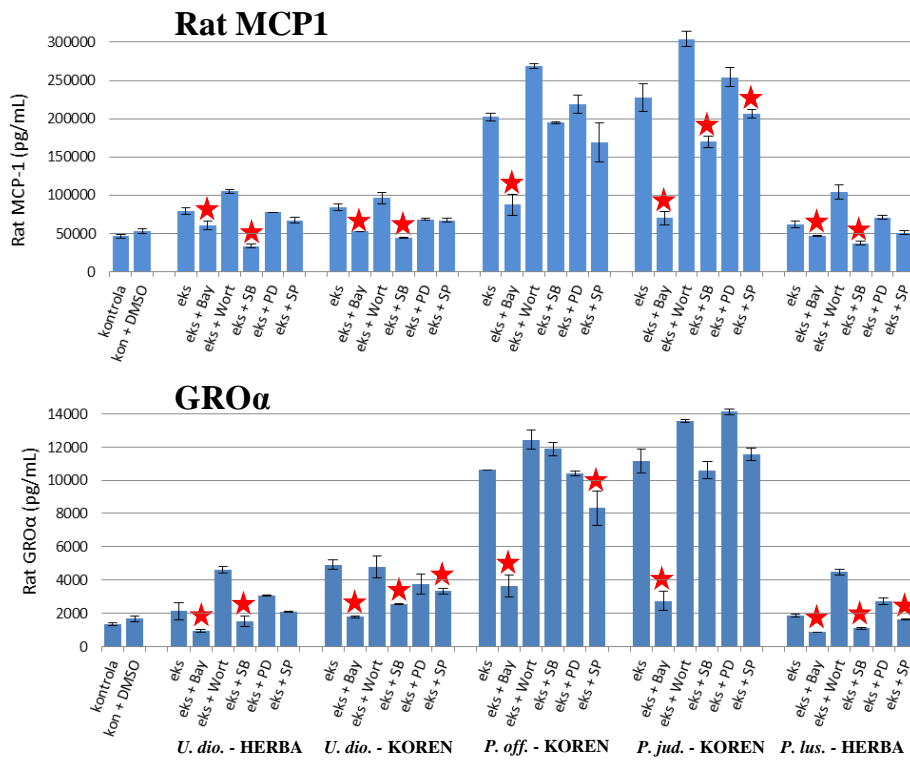
Glavni *downstream* signalni put u ćeliji nakon aktivacije TLR-MyD88 je, već pomenuti, NF- κ B signalni put koji aktivira transkripciju gena za citokine rat MCP1 i GRO α . Iako u manjem obimu, do transkripcije gena za ove citokine može doći i aktivacijom drugih signalnih puteva, pre svega Akt i MAPK signalinga. Akt signalni put je posredovan fosfatidilinozitol-3-kinazom i AKT-om tj. protein kinazom B i njegova uloga je promovisanje preživljavanja ćelije (ekspresija antiapoptotičkih proteina). Signalni put MAP kinaza (eng. *mitogen activated protein kinase*) uključuje brojne protein kinaze kao što su p38, JUN (eng. *Jun N-terminal kinase*) i ERK (eng. *extracellular regulated kinase*). Ovaj signalni put se aktivira kao odgovor na stres i učestvuje u ekspresiji brojnih gena za citokine (poglavlje 2.3.3.2.).

U cilju identifikacije preko kojih signalnih puteva ekstrakti povećavaju sekreciju citokina rat MCP1 i GRO α primenjeno je 5 inhibitora protein kinaza. Inhibitori, njihovi ciljni proteini kao i signalni put u kojem učestvuju su dati u *Tabeli 4.20*.

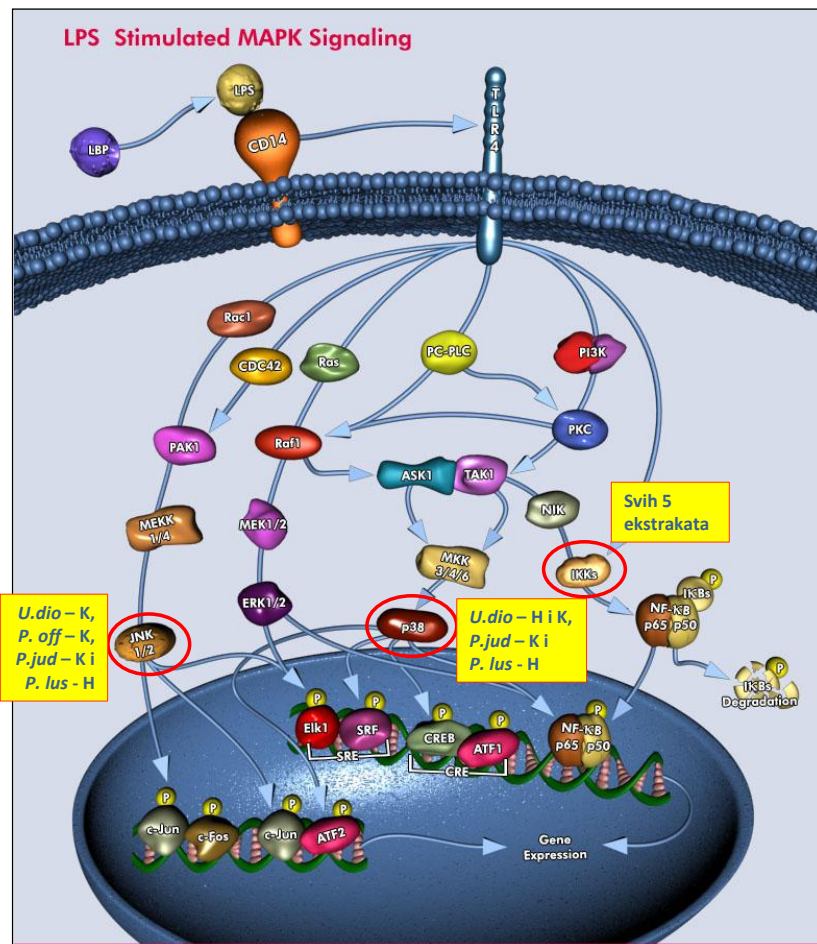
Tabela 4.20. Primenjeni inhibitori, njihovi ciljni proteini kao i signalni put u kojem učestvuju.

Inhibitor	Kinaza koju inhibira	Inhibirani signalni put
Bay 11-7082	Inhibirani signalni put	NF- κ B signalni put
Wortmannin	I κ B-a fosforilaza	Akt signalni put
SB203580	NF- κ B signalni put	MAPK signalni put
PD98059	Fosfatidilinozitol-3-kinaza	MAPK signalni put
SP600125	Akt signalni put	MAPK signalni put

Princip eksperimenta jeste inkubacija ekstrakata sa i bez inhibitora i određivanje nivoa citokina nakon 24h. Ukoliko u prisustvu inhibitora za određen signalni put dođe do smanjenja sekrecije citokina u odnosu na probu u kojoj je samo ekstrakt, znači da komponente ekstrakta interreaguju upravo sa signalnim molekulima u tom putu. Primenjene radne koncentracije ekstrakata su bile 50 μ g/mL za ekstrakte korena vrsta roda *Parietaria* a za ostale 100 μ g/mL. Rezultati sekrecije citokina rat MCP1 i GRO α dati su na *Slici 4.52*. (*Prilog 8.9.2.*, *Tabele 8.33.* i *8.34.*). Zvezdicom su označene probe u kojima je došlo do smanjene sekrecije citokina. U slučaju svih ekstrakata, primenom inhibitora fosforilacije inhibitorne subjediničice NF- κ B faktora došlo je do drastičnog smanjenja sekrecije što ukazuje da svi ekstrakti stimulišu ovaj signalni put. Suprotno tome, primenom inhibitora Wortmannin-a, nije došlo do smanjenja sekrecije citokina što ukazuje da komponente ekstrakta nemaju uticaj na Akt signalni put. Sporadični efekti su primećeni primenom inhibitora MAP kinaza (kod inhibicije p38 i JNK) ali mnogo manjeg obima u odnosu na probe sa inhibitorom Bay 11-7082. Sumarni prikaz dejstva ekstrakata na ispitivane signalne puteve dat je na *Slici 4.53*.



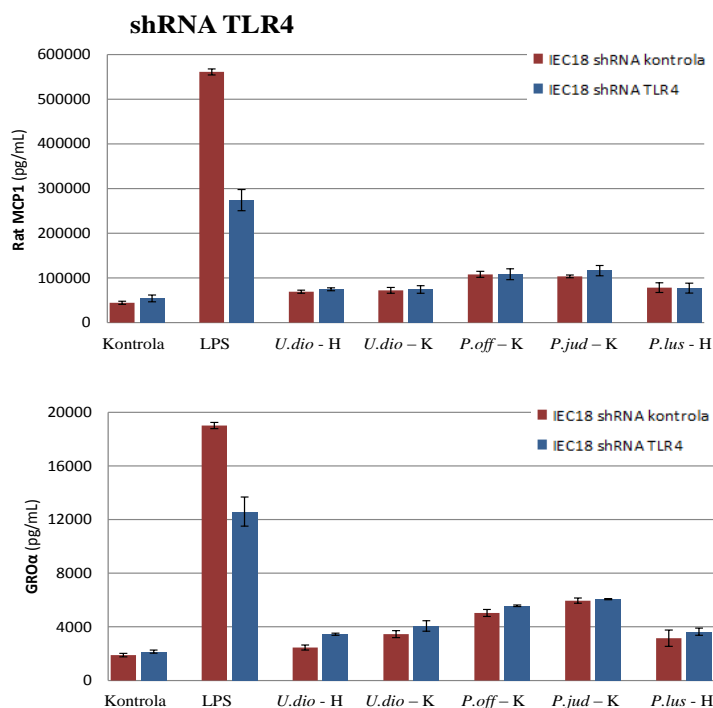
Slika 4.52. Sekrecija rat MCP1 (gore) i GROα (dole) pod uticajem inhibitora i odabranih metanolnih ekstrakata.



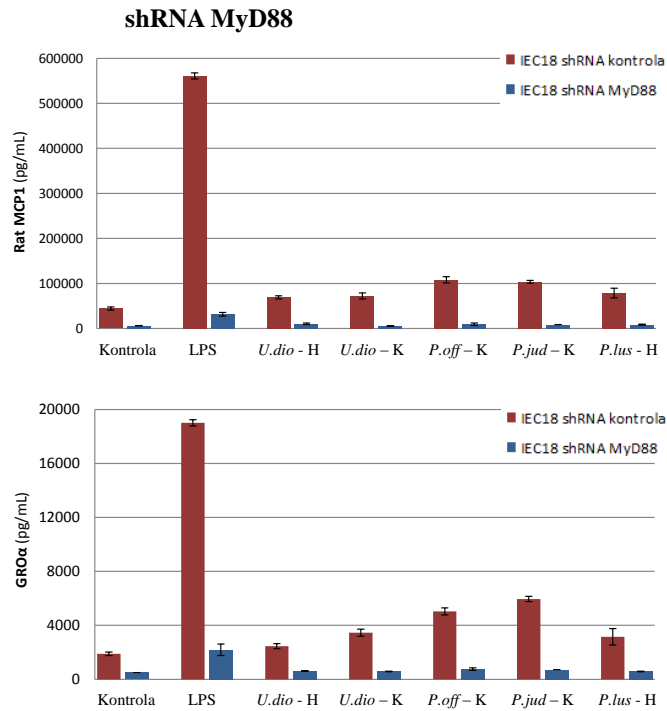
Slika 4.52. Sumarni prikaz dejstva odabranih metanolnih ekstrakata na ispitivane signalne puteve. Ekstrakti vrsta navedenih u žutim kvadratima stimulišu sekreciju rat MCP1 i GROα preko zaokruženih signalnih molekula.

4.5.1.2. Uticaj ekstrakata na aktivaciju TLR4 i MyD88 signalnog puta

LPS svoj efekat ispoljava vezivanjem za TLR4 receptor kojeg ekspresuju IEC18 ćelije. Dalji prenos signala u ćeliju posredovan je njegovim adaptivnim proteinom MyD88. Pokazano je u prethodnom eksperimentu da pet ekstrakata stimuliše sekreciju citokina u odsustvu LPS-a. Stoga je sledeći eksperiment služio da se utvrdi da li i komponente ekstrakata povećavaju sekreciju citokina preko istog mehanizma kao i LPS. U tu svrhu koristile su se ćelije koje imaju utihnute gene za TLR4 odnosno MyD88 i određivao se uticaj ekstrakata (radne koncentracije su bile 50 µg/mL za ekstrakte korena vrsta roda *Parietaria* a za ostale 100 µg/mL) na sekreciju citokina iz tih ćelija. Ćelije koje ne ekspresuju jedan od ova dva proteina imaju slabiji odgovor na proinflamatorne stimuluse i produkcija citokina je znatno smanjena. Ukoliko je stimulacija sekrecije citokina rat MCP1 i GRO α ekstraktima posredovana proteinima TLR4 ili MyD88, sekrecije citokina će se smanjiti kod ćelija koje ne ekspresuju TLR4 ili MyD88. Rezultati su predstavljeni na Slikama 4.53. i 4.54. (Prilog 8.9.2., Tabele 8.35. i 8.36.) Kod ćelija sa shRNA za protein MyD88 drastično je smanjena sekrecija oba citokina (plavi stubići) u odnosu na odgovarajuću kontrolu (crveni stubići) bez obzira na dodatak ekstrakata odnosno LPS-a. Nasuprot tome, u slučaju ćelija sa utihnutim genom za TLR4 nema značajnih promena sekrecije citokina u probama sa ekstraktima. Međutim, LPS kod ćelija koje ne ekspresuju ovaj receptor nije uspeo da održi sekreciju citokina kao u kontroli što je i očekivano s obzirom da je TLR4 glavno mesto vezivanja lipopolisaharida. Ovo ukazuje da komponente ekstrakata ne intereaguju sa ovim receptorom ali je njihov efekat jeste posredovan MyD88 adaptivnim proteinom. Pošto MyD88 ima funkciju adaptivnog proteina kod većine Toll-like receptora (Tabela 2.4., poglavlje 2.3.3.2.) može se zaključiti da komponente ekstrakata svoj efekat ispoljavaju preko nekog drugog TL receptora čiji je MyD88 adaptivni protein. Veoma je teško pretpostaviti, zbog kompleksnosti hemijskog sastava ekstrakta, koji TL receptori su target proteini za vezivanje komponenti ekstrakata. Takođe, moguća je i direktna aktivacija MyD88 proteina lipofilnim komponentama ekstrakta koje prodiru kroz lipidni dvosloj ćelijske membrane.



Slika 4.53. Uticaj ekstrakata na sekreciju rat MCP1 i GRO α iz ćelija sa utihnutim genima za TLR4 protein.



Slika 4.54. Uticaj ekstrakata na sekreciju rat MCP1 i GRO α iz ćelija sa utihnutim genima za MyD88 protein.

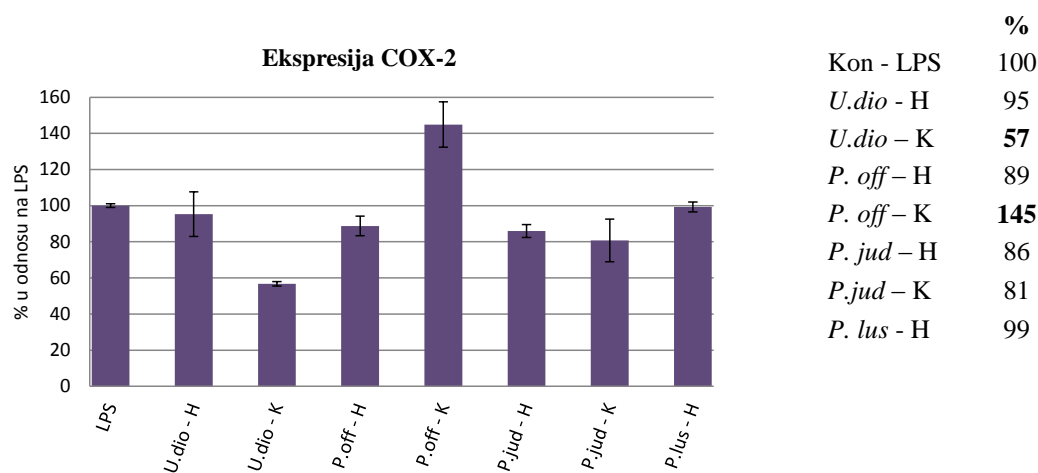
Sumiranjem rezultata uticaja ispitivanih ekstrakata na sekreciju proinflammatoryh citokina iz IEC18 ćelija može se zaključiti sledeće:

- 5 ekstrakata (*U.dioica* - herba i koren, koren - *P. officinalis* i *P. judaica*, *P. lusitanica* - herba) povećava sekreciju rat MCP1 i GRO α u bazalnim uslovima;
- Ekstrakti herbe i korena vrste *U. dioica* smanjuju LPS-om indukovanu produkciju rat MCP1 i GRO α ;
- Ekstrakti korena vrsta roda *Parietaria* ispoljavaju sinergistički efekat sa LPS-om;
- Svih 5 ekstrakata ispoljava svoj efekat preko signalnih puteva koji su posredovani MyD88 proteinom, preko NF- κ B signalinga, a neki i preko MAP kinaza (p38 i JNK).

4.5.2. Uticaj ekstrakata na ekspresiju COX-2 u IEC18 ćelijama

Intestinalne epitelne ćelije ekspresuju COX-2 enzim u okviru odgovora na proinflammatory faktore kao što su LPS, TNF- α , oksidativni stres itd. Dejstvom COX-2 u ovim ćelijama najviše se proizvodi PGE₂ a zatim PGF_{2 α} i PGD₂ (Eckmann i sar, 1997; Longo i sar, 1998). Ekspresija COX-2 u enterocitima u odsustvu stimulusa je veoma niska (Singer i sar, 1998). U ovom eksperimentu, uticaj ekstrakata (radne koncentracije su bile 50 μ g/mL za ekstrakte korena vrsta roda *Parietaria* a za ostale 100 μ g/mL) na ekspresiju ovog enzima vršen je u uslovima LPS-indukovane inflamacije. Nivo ekspresije COX-2 utvrđen je metodom Western blota i rezultati su normalizovani u odnosu na kontrolu sa LPS koja je predstavljala 100%-nu ekspresiju. Rezultati Western blot analize su dati u *Prilogu 8.9.3.*, *Tabela 8.37.* a slike samih gelova nakon vizuelizacije u *Dodatnom materijalu* na CD-u. Sa histograma (*Slika 4.55.*) je evidentno da ekstrakti herbi *U. dioica* i *P. lusitanica* ne menjaju LPS-om indukovanu ekspresiju COX-2 enzima, a ekstrakti *P. officinalis* - herba, *P. judaica* - herba i koren je tek blago smanjuju. Drastične promene ekspresije ovog enzima su izazvali ekstrakti korena vrsta *U. dioica* i *P. officinalis*. Povećanje ekspresije COX-2 od 145% u odnosu na sam LPS je izazvao ekstrakt korena vrste *P. officinalis*. Ovo je u saglasnosti sa njegovim proinflammatorym efektom određenim u prethodnom eksperimentu gde je izrazito povećao

sekreciju citokina rat MCP1 i GRO α . Generalno, povećanje ekspresije COX-2 i time povećanje biosinteze prostaglandina smatra se proinflatornim efektom koji može imati negativne posledice. Međutim, primena COX-inhibitora u tretmanu crevnih upalnih bolesti je veoma neefektivna (Lopez-Posadas i sar, 2010). Smatra se da prostaglandini produkovani u epitelu učestvuju u ublažavanju inflamacije i u procesima zaceljenja (Wallace, 2006) kao i održavanju homeostaze intestinuma (Newberry i sar, 1999). Posebno zaslužan za ove efekte je prostaglandin PGE₂ kada se vezuje za svoje receptore EP₂ ili EP₄ (Stenson, 2007). Stoga, povećanje ekspresije COX-2 primenom ekstrakta korena vrste *P. officinalis* može biti veoma korisno i primenljivo u tretmanu inflamatornih poremećaja intestinuma. Sa druge strane, prekomerna ekspresija COX-2 i produkcija prostaglandina je povezana sa patologijom kolonorektalnog kancera. Povećan rizik od formiranja ovog kancera postoji kao posledica hroničnih upala creva. Zbog toga je smanjenje ekspresije COX-2 na 57% od samog LPS-a, koju je uzrokovao ekstrakt korena vrste *U. dioica* značajno u prevenciji ovih patoloških stanja.



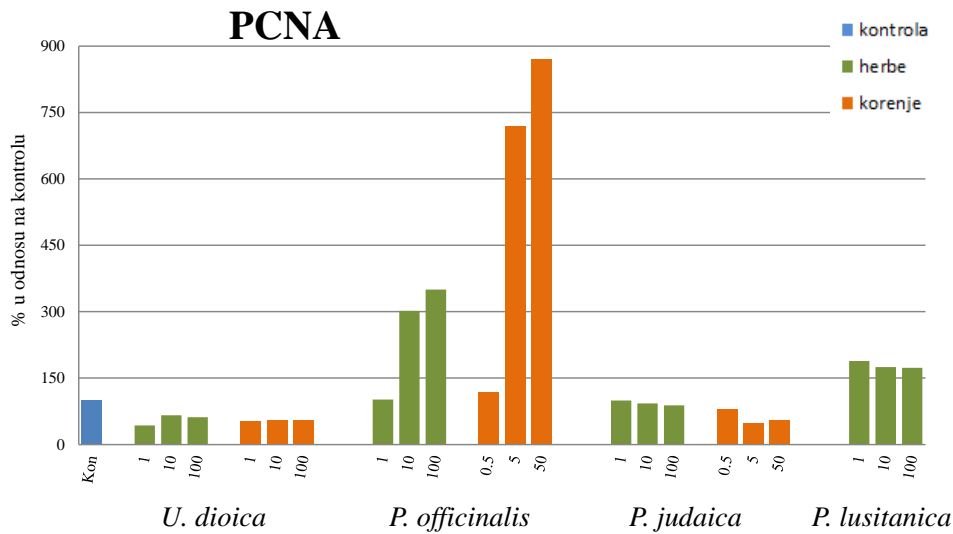
Slika 4.55. Uticaj odabranih ekstrakata na ekspresiju enzima COX-2 u uslovima LPS-indukovane inflamacije.

4.5.3. Efekat epitelizacije

Upalne bolesti creva karakteriše učestala i hronična inflamacija koja može dovesti do formiranja oštećenja na epitelu i sporog zaceljivanja. Što je bolest više uznapredovala to se javljaju ozbiljnije mukozne lezije. Ipak, cilj terapija obolenja kao što su Kronova bolest i ulcerozni kolitis je pre svega bio saniranje simptoma a ne oporavak crevne sluznice. Međutim, u poslednje vreme glavni akcenat u tretiranju ovih bolesti je prebačen na oporavak oštećenje crevne sluznice (Andujar i sar, 2013). Novija klinička ispitivanja ukazuju da rani oporavak mukoze rezultuje boljim izgledima za oporavak pacijenata sa ulceroznim kolitisom (Colombel i sar, 2011). Obnavljanje epitela gastrointestinalnog trakta se odvija u tri faze. Prvo dolazi do migracije ćelija koje okružuju povredu na mesto same povrede u cilju zatvaranja monosloja. Ukoliko je oštećena velika površina epitela, dolazi do povećanja proliferacije ćelija epitela i na kraju njihove maturacije i formiranja kontinualnog monosloja epitela.

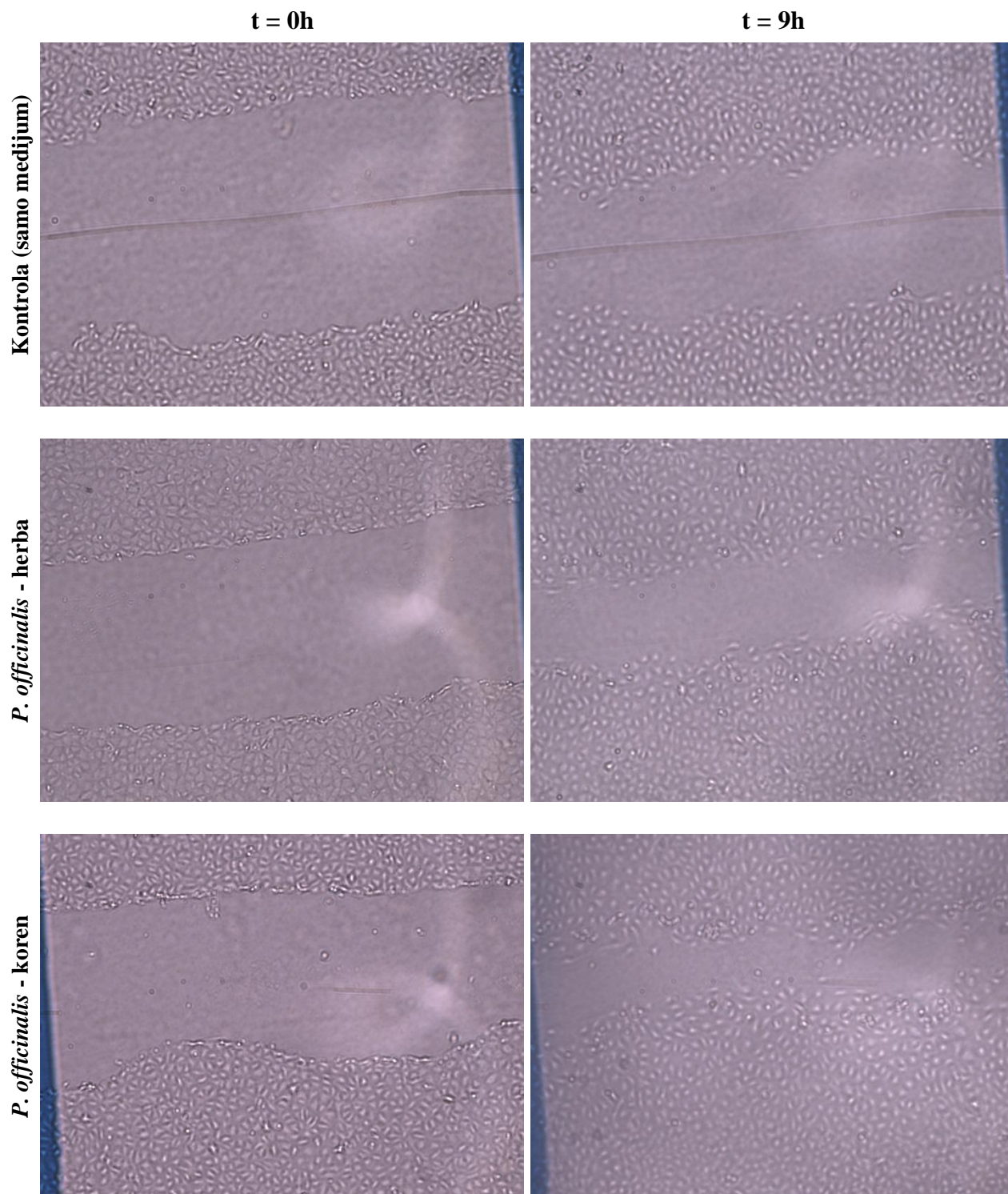
Preliminarni skrining uticaja ekstrakata na proliferaciju IEC18 ćelija određen je merenjem ekspresije PCNA (eng. *proliferating cell nuclear antigen*) odnosno, proliferativnog antigena metodom Western blota-a. Ovaj protein ima esencijalnu ulogu prilikom replikacije DNK i njegova količina je proporcionalna intenzitetu proliferacije ćelija. Rezultati Western blot analize su dati u *Prilogu 8.9.4., Tabela 8.38.* a slike samih gelova nakon vizuelizacije u *Dodatnom materijalu* na CD-u. Na *Slici 4.56.* su predstavljeni rezultati uticaja ekstrakta na ekspresiju PCNA, normalizovani na kontrolu (kon = 100%, ćelije gajene samo u medijumu). Svi ekstrakti su testirani u tri koncentracije date na X-osi u $\mu\text{g/mL}$. Najizraženiji proliferativni efekat su ispoljili ekstrakti herbe a naročito korena vrste *P. officinalis* koji su dozno-zavisno povećali ekspresiju ovog proteina. Ekstrakt korena vrste *P. officinalis* je, pri koncentraciji

od 50 µg/mL čak 9 puta povećao ekspresiju PCNA u odnosu na kontrolu. Do povećanja ekspresije PCNA došlo je i primenom ekstrakta herbe vrste *P. lusitanica*, međutim, ne tako drastičnog kao kod prethodno pomenutih ekstrakata i ne dozno-zavisnog.



Slika 4.56. Uticaj odabranih ekstrakata na ekspresiju PCNA (eng. *proliferating cell nuclear antigen*). Svaki ekstrakt je rađen u tri radne koncentracije (vrednosti date na X-osi u µg/mL).

Ovi rezultati ukazuju na izuzetan proliferativni uticaj ekstrakata herbi i korena vrste *P. officinalis* te je ispitan njihov uticaj direktno na IEC18 ćelijama. Ćelije čiji je monosloj bio narušen (Slika 4.57.) su inkubirane sa ova dva ekstrakta (herba - 10 µg/mL a koren - 5 µg/mL) ili samo sa medijumom (kontrola). Posmatrana je brzina zatvaranja rane, odnosno, migracija i proliferacija IEC18 ćelija tako da se spoje dva razdvojena dela monosloja. Ćelije, tačnije, rezrezi na monosloju su uslikani odmah ($t=0h$) i nakon 9h inkubacije sa ekstraktima pri uvećanju od 40 puta i određene su njihove relativne površine. Rezultati su predstavljeni u Tabeli 4.21. a slike razreza (narušenih monoslojeva) su date u Dodatnom materijalu na CD-u. Kod ćelija inkubiranih sa ekstraktima došlo je do bržeg zatvaranja rane i to 26,4 % kod ekstrakta korena i 22,5 % kod ekstrakta herbe u odnosu na kontrolu. Proliferativni efekat ili efekat zarastanja rane (eng. *wound healing*) ovih ekstrakata se može iskoristiti u terapijama oporavka sluznice intesituma. Sve je veća primena lekovitih biljaka u terapijama hroničnih upalnih bolesti creva (Recio i sar, 2012). Tome u prilog idu i rezultati istraživanja Andujar-a i saradnika (2013) prema kojima šikonin, naftohinon izolovan iz korena vrste *Lithospermum erythrorhizon*, takođe, stimuliše migraciju IEC-a i ubrzava zarastanje rane, te je okarakterisan kao potencijalni terapeutik kod intestinalnih inflamacija. Međutim, u slučaju ekstrakata ispitivanih u ovom radu, potrebno je biti posebno oprezan posebno sa ekstraktom korena vrste *P. officinalis*. Ovaj ekstrakt poseduje značajni proliferativni efekat ali takođe stimuliše ekspresiju enzima COX-2 i sekreciju hemokina rat MCP1 i GRO α . Stoga bi trebalo biti na oprezu u eventualnoj primeni ovog ekstrakta u terapiji upalnih procesa. Pre konačnog zaključka, bilo bi potrebno sprovesti *in vivo* istraživanja. Suprotno ovom ekstraktu korena, ekstrakt herbe *P. officinalis* poseduje ne manji proliferativni efekat a da pri tom ne povećava sekreciju pomenutih hemokina i COX-2 što ga svakako čini boljim kandidatom za potencijalno pomoćno sredstvo u terapiji upalnih bolesti creva.



Slika 4.57. Izgled reprezentativnih “proreza” na IEC18 monosloju pre i nakon 9h inkubacije, pri uvećanju od 40x – kontrola (prvi red), sa ekstraktima *P. officinalis* – herba (drugi red) i *P. officinalis* - koren (treći red).
Slike svih “proreza” date su u *Dodatnom materijalu* na CD-u.

Tabela 4.21. Rezultati uticaja ekstrakata herbe i korena vrste *P. officinalis* na zarastanje rane na IEC18 ćelijama kao model sistemu.

Oznaka rane	Kontrola (samo medijum)			<i>P. officinalis</i> – herba (c = 10 µg/mL)				<i>P. officinalis</i> – koren (c = 5 µg/mL)			
	RP* (t = 0h)	RP (t = 9h)	ΔRP**	Oznaka rane	RP (t = 0h)	RP (t = 9h)	ΔRP	Oznaka rane	RP (t = 0h)	RP (t = 9h)	ΔRP
1-1a-i	1395538	725387	670151	4-1a-d	1184891	616003	568888	13-1a-i	1146732	410185	736547
1-1b-d	1076694	607747	468947	4-2a-d	1092934	562923	530011	13-1b-d	1148117	415572	732545
1-1b-i	1357569	752388	605181	4-2a-i	1077446	450561	626885	13-2a-d	886957	280566	606391
1-2a-i	1215119	636653	578466	4-3a-d	1168998	607130	561868	13-2a-i	911040	310946	600094
1-3b-d	798710	283498	515212	4-3b-i	1225162	650378	574784	13-3b-i	828952	130097	698855
2-1a-i	1090114	563617	526497	5-1a-d	1096467	344857	751610	14-1b-d	943252	335082	608170
2-2b-i	956892	378087	578805	5-1a-i	1108483	376046	732437	14-1b-i	1109170	438807	670363
2-3a-d	920399	431936	488463	5-1b-d	1120731	390690	730041	14-2b-d	875516	239568	635948
2-3a-i	841324	317324	524000	5-3a-i	1193125	606676	586449	14-2b-i	947732	264694	683038
2-2a-d	951411	426656	524755	5-3b-d	1187443	564152	623291	14-3a-i	897956	315555	582401
3-1a-i	1310965	841872	469093	6-1a-d	1072759	403563	669196	15-1a-i	1131588	568299	563289
3-2a-d	1131840	725689	406151	6-1b-i	1080608	476421	604187	15-1b-d	1109662	295685	813977
3-2b-d	1118280	645217	473063	6-2a-i	1091289	475673	615616	15-2a-d	1218567	663675	554892
3-2b-i	1149113	579334	569779	6-3a-i	910378	244497	665881	15-2b-i	1223352	635543	587809
3-3a-i	845115	373107	472008	6-3b-d	1077715	466569	611146	15-3b-d	1139225	462101	677124
			514316				630153				650096
				122,5 % u odnosu na kontrolu				126,4 % u odnosu na kontrolu			

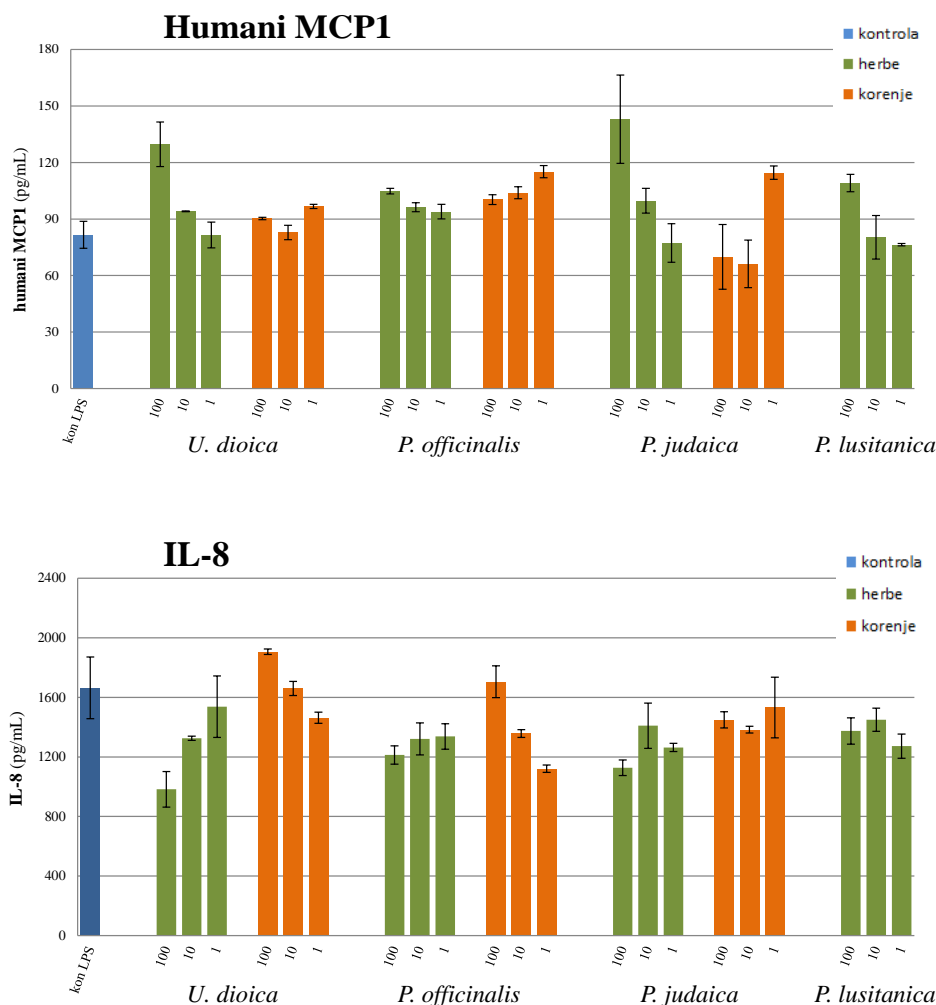
*RP (relativna površina) "rane" tj. površina na kojoj nema IEC18 ćelija određena u programu Image J;

**ΔRP = RP (t = 0h) - RP (t = 9h) i predstavlja relativnu površinu koju su prekrile novoizrasle IEC18 ćelije u toku 9h inkubacije sa ili bez ekstrakata.

4.5.4. Uticaj ekstrakata na sekreciju proinflamatornih citokina (IL-8 i humanog MCP1) iz Caco2 ćelija

Caco2 ćelijska linija predstavlja besmrtnu humane ćelije kolonorektalnog adenokarcinoma i takođe se koristi kao model sistem intestinalnih epitelnih ćelija. Glavna prednost ove ćelijske linije u odnosu na IEC18 ćelije pacova jeste što su Caco2 humane ćelije. Međutim, glavna mana ovih ćelija za njihovu primenu kao model sistema jeste što su to kancerne ćelije te imaju izmenjen metabolizam u odnosu na zdrave ćelije kolona. Ipak, i pored toga je sproveden veliki broj *in vitro* istraživanja apsorpcije i metabolizma lekova i suplemenata na ovim ćelijama (Mace i sar, 1998).

Kao i IEC18 ćelije i Caco2 ćelije ekspresuju receptore (uglavnom TLR-ove) za prepoznavanje molekularnih obrazaca različitih patogena i učestvuju u nespecifičnom imunom odgovoru gastrointestinalnog trakta. Kao odgovor na strane mikroorganizme, ove ćelije proizvode hemokine, najčešće, humani MCP1 i IL-8. Humani MCP1, slično MCP1 iz pacova, vrši privlačenje monocita, T-limfocita, dendritskih i NK ćelija na mesto inflamacije dok IL-8, predstavlja humanu verziju pacovskog hemokina GRO α , te mu je funkcija privlačenje neutrofila. Na ovaj način, Caco2 ćelije posreduju u mobilizaciji leukocita i proširenju inflamatornog odgovora.

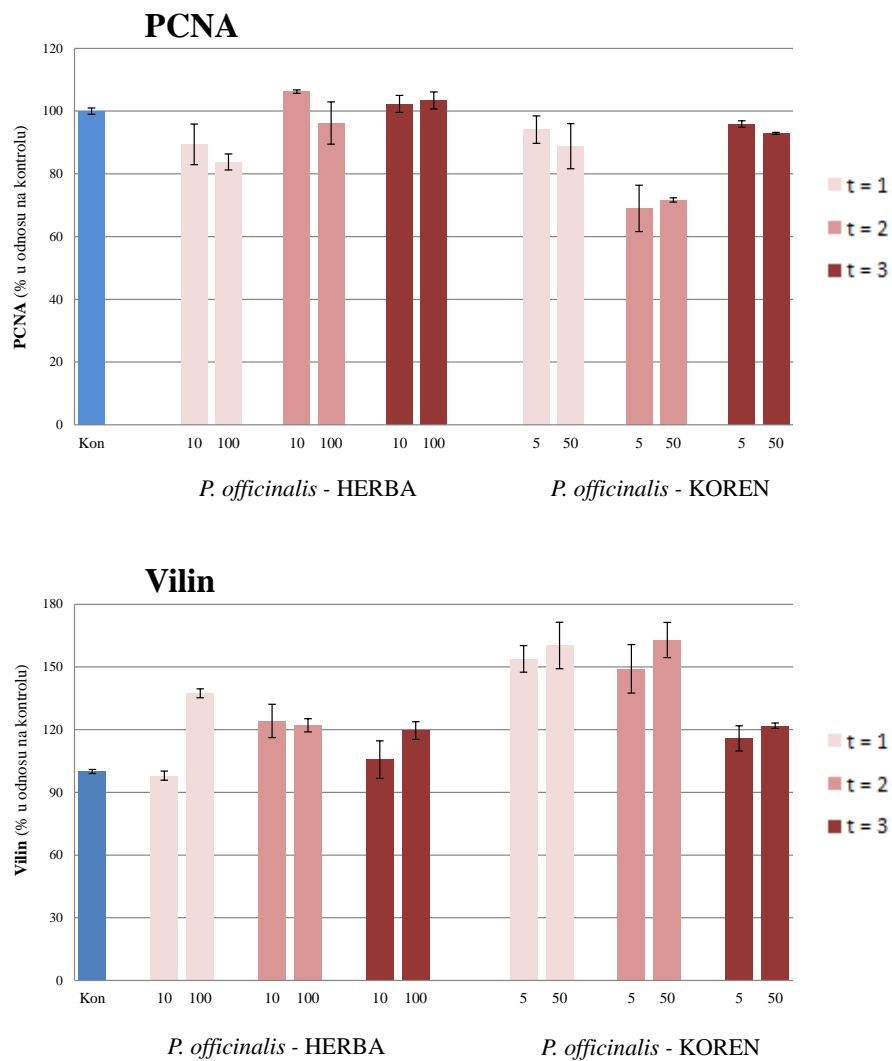


Slika 4.58. Uticaj odabranih metanolnih ekstrakata na sekreciju humanog MCP1 (gore) i IL-8 (dole) u uslovima LPS-om izazvane inflamacije. Kontrola (plavi stubić) predstavlja referentni nivo sekrecije i u odnosu na nju se posmatra da li ekstrakti stimulišu ili inhibiraju sekreciju datog citokina. Svaki ekstrakt je rađen u tri radne koncentracije (vrednosti date na X-osi u $\mu\text{g/mL}$).

Određen je uticaj odabranih metanolnih ekstrakata na produkciju hMCP1 i IL-8 u bazalnim i uslovima LPS-stimulisane inflamacije. Pošto je produkcija ova dva hemokina u odsustvu stimulisa (-LPS) bila izuzetno niska tj. jednaka bazalnim vrednostima dobijenim za kontrolu, smatra se da ekstrakti nisu menjali obrazac sekrecije ovih citokina te su ti rezultati izostavljeni. Rezultati uticaja ekstrakata na sekreciju hemokina u LPS-stimulisanoj inflamaciji su prikazani na histogramima (Slika 4.58. i u Prilogu 8.9.5., Tabele 8.39. i 8.40.). Svi ekstrakti su dodati u tri radne koncentracije (vrednosti date na X-osi u $\mu\text{g/mL}$). Sekreciju hMCP1 su povećali ekstrakti herbi vrsta *U. dioica*, *P. judaica* i *P. lusitanica* i to u dozno-zavisnom maniru. Ostali ekstrakti jesu povećali sekreciju ovog citokina ali u znatno manjem obimu i ne primećuje se dozno-zavisni uticaj. Najizrazitiji uticaj na sekreciju hemokina IL-8 ispoljio je ekstrakt herbe koprive. Naime, ovaj ekstrakt je dozno-zavisno smanjio sekreciju ovog proinflatornog hemokina i to na 59 % u odnosu na LPS-om izazvanu sekreciju, pri radnoj koncentraciji od 100 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrakt korena iste vrste je blago povećao sekreciju IL-8 (za 15%) ali tek pri najvišim koncentracijama te se ovo ne može smatrati značajnim proinflatornim efektom. U slučaju ekstrakta korena vrste *P. officinalis*, smanjenjem koncentracije ekstrakta smanjila se i sekrecija IL-8 i to na 67 % od LPS-indukovane sekrecije. Ovi rezultati ukazuju da ovaj ekstrakt pri visokim koncentracijama stimuliše a pri nižim smanjuje sekreciju IL-8. Ostali ekstrakti su smanjili sekreciju ovog hemokina ali ne u značajnijoj meri.

4.5.5. Uticaj ekstrakata na proliferaciju Caco2 ćelija

Ekstrakti herbe i korena vrste *P. officinalis* su ispoljili izrazit proliferativni efekat na IEC18 ćelijama. Inkubacijom IEC18 ćelija sa ovim ekstraktima došlo je do povećanja ekspresije proteina PCNA koji je marker proliferacije ćelija jer je esencijalan u toku transkripcije DNK. Narednim eksperimentom je potvrđen efekat zarastanja rana, tj. primenom ovih ekstrakata došlo je do bržeg zatvaranja razdvojenog monosloja ćelija. Zbog ovakvih svojstava ekstrakata herbe i korena vrste *P. officinalis* bilo je interesantno ispitati njihov uticaj na proliferaciju Caco2 ćelija kao model sistema humanog epitela GIT-a. U tom cilju određena je ekspresija proteina PCNA i vilina metodom Western blot-a. Vilin je protein koji učestvuje u formiranju aktinskih filamenata te učestvuje u ćelijskoj migraciji, deobi, formiranju i održavanju četkastog pokrova epitelnih ćelija (Ferrary i sar, 1999; Sudeep i sar, 2007). Radi boljeg uvida u mehanizam delovanja ekstrakata, ova dva proteina su kvantifikovana iz ćelija koje su postigle 70-80% monosloja ($t = 1$), zatim iz ćelija koje su formirale monosloj - konfluentne ćelije ($t = 2$) i tri dana nakon postignute konfluencije ($t = 3$). Rezultati Western blot analize su dati u Prilogu 8.9.6., Tabela 8.41. a slike samih gelova nakon vizuelizacije u Dodatnom materijalu na CD-u. Sa Slike 4.59. evidentno je da ekstrakti nisu značajno uticali na ekspresiju proliferativnog antigena. Čak je ekstrakt korena *P. officinalis* smanjio ekspresiju PCNA u konfluentnim ćelijama. Ovo je suprotno efektima koje je ovaj ekstrakt ispoljio na IEC18 ćelijama. Međutim, ovaj ekstrakt je povećao ekspresiju proteina vilina u ćelijama neposredno pre i za vreme konfluencije i to za 60% u odnosu na kontrolu. Ekstrakt herbe iste vrste jeste povećao ekspresiju ali za svega 20%. Ovi rezultati se mogu protumačiti time da su ekstrakti, naročito ekstrakt korena, stimulisali reorganizaciju ćelijskog skeleta. Pošto nije došlo do intenziviranja ćelijske deobe, može se zaključiti da su ekstrakti stimulisali ćelijsku migraciju ali ne i proliferaciju.



Slika 4.59. Uticaj ekstrakata herbe i korena vrste *P. officinalis* na ekspresiju PCNA (gore) i vilina (dole). (t = 1) postignuto 70-80% monosloja, (t = 2) ćelije koje su formirale monosloj - konfluentne ćelije i (t = 3) tri dana nakon postignute konfluencije. Svaki ekstrakt je rađen u dve radne koncentracije (vrednosti date na X-osi u $\mu\text{g/mL}$).

4.6. Uticaj zagađenosti sredine na akumulaciju teških metala, fiziološke parametre i biološki potencijal vrste *Urtica dioica* L.

Biljke imaju sposobnost absorpcije a neke i akumulacije, jona teških metala prisutne u životnoj sredini. Najčešće se vrši absorpcija preko korena, ali moguća je i penetracija ovih polutanata preko kutikule lista tzv. lisna absorpcija. Prema tome, biljke mogu biti dobri bioindikator nivoa zagađenja zemljišta ili vazduha. Međutim, joni teških metala deluju negativno na samu biljku jer mogu da učestvuju u produkciji reaktivnih vrsta u Fentonovoj i Haber-Weiss-ovoj reakciji, blokiraju esencijalne funkcionalne grupe u proteinima i polinukleotidima i mogu dovesti do supstitucije kofaktornih jona metala sa drugim, neodgovarajućim jonom (Mithofer i sar, 2004). To rezultuje smanjenjem rasta biljke, inhibicijom respiracije, fotosinteze, odnosa biljka-voda, metabolizma azota itd. (Zenk, 1996; Michalak, 2006). Biljka na stres izazvan teškim metalima reaguje povećanjem biosinteze biljnih fenola koji mogu da helatiraju ove jone i neutrališu nastale slobodne radikale (objašnjeno u poglavlju 2.3.1.) (Michalak, 2006).

U ovom radu određen je uticaj vazdušnog zagađenja na fiziološke parametre, akumulaciju teških metala i biološku aktivnost koprive. Kao nezagađen lokalitet odabran je Zmajevac na Fruškoj Gori, a kao zagađen odmorište pored prometne saobraćajnice Iriškog venca. Na samom terenu, iz intaktnih listova izmereni su fiziološki parametri dati u *Tabeli 4.22*. Intenzitet fotosinteze je bio smanjen za 36 % kod biljke na zagađenom lokalitetu kao i efikasnost korišćenja vode (WUE) za čak 41 %. Koncentracija CO₂ u stominoj duplji je bila veća za 30 % u zagađenim uslovima ukazujući slabiju iskorišćenost ovog jedinjenja u procesu fotosinteze. Suprotno tome, intenzitet transpiracije nije bitno promenjen a provodljivost stoma čak povećana kod biljke na zagađenom lokalitetu, što ukazuje da vazdušno zagađenje nije uticalo na razmenu gasova između biljke i sredine (izbacuje se O₂ a usvaja CO₂).

Tabela 4.22. Fiziološke karakteristike koprive na zagađenom i nezagađenom lokalitetu

Lokalitet	Intenzitet fotosinteze	Intenzitet transpiracije	WUE	Provodljivost stoma (gs)	Koncentracija CO ₂ u stominoj duplji (ci)
Nezagađen	11,04	3,21	3,46	0,19	191,22
Zagađen	7,11	3,50	2,05	0,23	249,11
Promena usled zagađenja	↓36 %	↑9 %	↓41 %	↑21 %	↑30 %

Koncentracija svih fotosintetičkih pigmenata u listovima koprive, drastično je smanjena usled vazdušnog zagađenja (*Tabela 4.23.*) a očigledniji primer je hlorofil a, gde je izmereno smanjenje koncentracije od čak 73 % u odnosu na listove u nezagađenoj sredini. Ovi rezultati ukazuju da je intenzitet fotosinteze smanjen upravo zbog manje koncentracije fotosintetičkih pigmenata u biljci izloženoj vazdušnom zagađenju.

Tabela 4.23. Sadržaj fotosintetičkih pigmenata u listovima koprive na zagađenom i nezagađenom lokalitetu

Lokalitet	Hlorofil a	Hlorofil b	Ukupni hlorofili (a+b)	Karotenoidi
	mg/g suve materije			
Nezagađen	14,13	5,22	19,32	3,75
Zagađen	3,83	4,01	7,71	1,71
Smanjenje usled zagađenja	↓73 %	↓23 %	↓60 %	↓54 %

Analizom sadržaja teških metala u biljnom materijalu sa ova dva lokaliteta (*Tabela 4.24.*), može se zaključiti da je u koprivi sa zagađenog lokaliteta sadržaj teških metala veći, naročito Fe, Co i Pb, u odnosu

na biljku koja nije bila izložena zagađenju. Međutim, koncentracija ni jednog metala nije premašila granicu tolerancije u biljkama (Kabata-Pendias, 2011) što ukazuje da kopriva ne vrši bioakumulaciju ovih polutanata. Suprotno tome, prema istraživanju Gjorgieva i saradnika (2011), kopriva je okarakterisana kao biakumulator Zn jer je u njenim listovima identifikovana koncentracija Zn bila čak 465 mg/kg. U uzorcima analiziranim u ovom radu koncentracija Zn u koprivi je bila zanemarljiva čak i u slučaju zagađenog lokaliteta.

Tabela 4.24. Koncentracije teških metala u koprivi sa zagađenog i nezagađenog lokaliteta

Granica tolerancije u biljkama [mg/kg]	Al	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Mo	Cd	Sn	Sb	Hg	Pb
	Do 1500	300	Do 300	0,02-1	0,1-5	5-30	27-90	1-1,7	0,2-5	0,05-2	-	7-50	-	5-10
Nezagađen	1227	62,0	210,9	0,09	0,75	4,19	1,10	0,148	2,02	0,037	0,010	0,005	0,006	0,33
Zagađen	1376	26,7	343,2	0,14	0,86	5,92	1,50	0,193	2,16	0,008	0,009	0,026	0,006	0,75
Promena zagađenja	usled ↑	↓	↑↑	↑↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↑	↓	↑↑

Suprotno literaturnim podacima, izlaganje biljke zagađenju nije rezultovalo povećanjem sinteze fenolnih komponenti. U Tabeli 4.25. dati su rezultati kvantitativne analize fenola LC-MS/MS metodom (poglavlje 4.1.3.) iz kojih se jasno vidi da je većina jedinjenja bila prisutna u većoj koncentraciji u biljci sa nezagađenog lokaliteta. Drastičan pad koncentracije, usled zagađenja, registrovan je za jedinjenja koja su dominantna u ekstraktima herbe koprive: rutin, hlorogenska i hinska kiselina. *p*-kumarinska kiselina je jedina detektovana u višoj koncentraciji kod uzorka sa zagađenog lokaliteta. Međutim, ukupan procentualni sastav fenolnih jedinjenjaja bio drastično snižen (za čak 59%) u herbi koprive koja je bila izložena vazдушnom zagađenju. Ovo se može objasniti niskim stepenom akumulacije jona teških metala u herbama koprive, čak i usled zagađenja. Pošto količina prisutnih jona nije prešla granice koje se smatraju toksičnim, nije došlo do aktivacije odbrambenih mehanizama biljke. Ipak, evidentno je da su biosintetski kapaciteti koprive ozbiljno narušeni kada je ona izložena vazдушnom zagađenju.

Tabela 4.25. Sadržaj fenolnih jedinjenja u herbama koprive na zagađenom i nezagađenom lokalitetu

Sadržaj (mg/g)	Lokalitet		Promena usled zagađenja
	Nezagađen	Zagađen	
<i>p</i> -OH-benzoeva k.	0,012	0,011	↓
Protokatehinska k.	0,071	0,055	↓↓
Hinska kiselina	0,253	0,150	↓↓↓
<i>p</i> -kumarinska k.	0,059	0,126	↑↑
Ferulna k.	0,039	0,034	↓
Kafena k.	0,465	0,315	↓↓
Hlorogenska k.	11,04	5,651	↓↓↓
Eskuletin	0,009	0,010	↑
Skopoletin	0,034	0,039	↑
Kem-3-O-Glc	0,050	0,031	↓↓
Kver-3-O-Glc	0,490	0,396	↓
Rutin	7,561	1,429	↓↓↓↓
Ukupno (%)	2,01	0,83	↓ 59%

Shodno smanjenom količinom fenolnih komponenti u uzorku sa zagađenog lokaliteta, smanjen je bio njegov biološki potencijal. U Tabelama 4.26. i 4.27. dat je pregled antioksidantnog i antiinflamatornog potencijala dva ekstrakta koprive sa zagađenog i nezagađenog lokaliteta. U svim antioksidantnim testovima (izuzev testa inhibicije lipidne peroksidacije) ekstrakt koprive sa zagađenog lokaliteta je ispoljio znatno slabiju antioksidantnu aktivnost (znatno više IC_{50} vrednosti), manju reduktivnu sposobnost (FRAP test) kao i niži sadržaj ukupnih fenola i flavonoida. Slični su i rezultati antiinflamatornog testa, u kojem je ekstrakt sa nezagađenog lokaliteta ispoljio veću sposobnost inhibicije COX-2 enzima dok je bilo suprotno za LOX enzim. Ipak, kod ovog testa nisu ispoljene velike razlike u aktivnosti ova dva ekstrakta.

Tabela 4.26. Antioksidantni potencijal ekstrakata herbi koprive sa zagađenog i nezagađenog lokaliteta

Lokalitet	DPPH	NO	IC_{50} (μ g/ml)			FRAP mg vitC/g	Fenoli mg galne/g	Flavonoidi mg rutina/g
			LP	OH	SOA			
Nezagađen	10,53	163,2	238	123,1	39,88	50,74	83,65	9,95
Zagađen	19,56	190,8	166	562,1	85,78	36,80	60,07	2,98
Promena usled	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓

Tabela 4.27. Antiinflamatorni potencijal ekstrakata herbi koprive sa zagađenog i nezagađenog lokaliteta

Lokalitet	IC_{50} (mg/ml)			
	12-HHT	PGE ₂	TXB ₂	12-HETE
Nezagađen	1.61	1.45	1.94	2.76
Zagađen	2.45	3.31	2.21	1.67
Promena usled zagađenja	↓	↓	↓	↑

Sumiranjem rezultata, može se zaključiti da kopriva ne predstavlja dobar bioindikator zagađenja životne sredine teškim metalima. S druge strane, njena upotreba je bezbedna bez obzira u kakvoj sredini raste, što opravdava poverenje narodne medicine u ovu biljku. Ipak, fiziološki parametri su bili znatno lošiji kod biljke izložene vazdušnom zagađenju, kao i njen biološki potencijal što treba imati u vidu prilikom odabira biljnog materijala u fitoterapiji.

5. Zaključak

Biljne vrste koje pripadaju tribusima Urticeae i Parietarieae, odnosno rodovima *Urtica* i *Parietaria* su od davnina prisutne u tradicionalnoj medicini i ljudskoj ishrani. Ova doktorska disertacija doprinosi ukupnim saznanjima o fitohemijskom sastavu i biološkim aktivnostima sledećih biljnih vrsta koje pripadaju pomenutim rodovima: *U. dioica* subsp. *dioica* var. *pubescens*, *U. dioica* subsp. *dioica* var. *dioica*, *U. kioviensis*, *P. officinalis*, *P. lusitanica* subsp. *lusitanica*, *P. judaica* subsp. *judaica* i *P. serbica*. Uprkos dugoj primeni ovih vrsta kao lekovitih biljaka, jedino je vrsta *U. dioica* ondok, kopriiva bila predmet naučnih istraživanja u značajnijem obimu dok su ostale vrste po prvi put detaljno okarakterisane u ovom radu. U ovoj doktorskoj disertaciji, date su informacije o hemijskom profilu ekstraktata pomenutih vrsta, njihovom antioksidantnom i antiinflamatornom potencijalu, uticaju na aktivnost enzima acetilholin esteraze, kao i njihov uticaj na imuni odgovor i proliferaciju intestinalnih epitelnih ćelija.

❖ Primenom tečnohromatografskih metoda LC-DAD-MS i LC-MS/MS izvršena je kvalitativna analiza odabranih metanolnih ekstraktata herbi i korena ispitivanih vrsta (za svaku vrstu odabrani su ekstrakti sa samo jednog lokaliteta). Preliminarno su identifikovane sledeće grupe jedinjenja: fenolne kiseline, flavonoidni glikozidi, lignani, aminoacil-konjugati, jedinjenja Mw = 310-330 i masne kiseline. Fenolne kiseline su bile zastupljenije u herbama *Urtica* vrsta, dok je u korenu vrste *U. dioica* identifikovan po prvi put derivat kafene kiseline klovamid (*N*-kafeoil-*L*-DOPA). Flavonoidni glikozidi su bili zastupljeniji u herbama kod svih ispitivanih vrsta, dok je jedini aglikon - epikatehin - detektvan u korenju *Parietaria* vrsta. Identifikovani su glikozidi kvercetina, kemferola, luteolina i izoramnetina. Vrsta *U. kioviensis* se izdvaja od ostalih ispitivanih jer su jedino u njenom ekstraktu herbe identifikovana čak tri *C*-glikozida, dok je rutin, veoma zastupljen u drugim herbama, u ovoj vrsti potpuno odsutan. Lignani su identifikovani jedino u korenu vrste *U. dioica* i to derivati sekoizolaricirezinola i neoolivila. Velik broj jedinjenja nazvan aminoacil-konjugatima je identifikovan isključivo u *Parietaria* vrstama, pretežno u ekstraktima korena.

❖ Sadržaj 44 fenolna jedinjenja i hinske kiseline određen je primenom LC-MS/MS tehnike u ekstraktima herbi, korena, lista, stabljike i cveta svih ispitivanih vrsta sa svih lokaliteta. U ekstraktima herbi detektovano je 16 jedinjenja kod *Urtica* vrsta, odnosno 15 kod *Parietaria* vrsta, u ekstraktima korena 10, odnosno 13; u ekstraktima lista 16, odnosno 14; u ekstraktima stabljike 11, odnosno 12 i u ekstraktima cveta 14, odnosno 15 komponenti. Na osnovu urađene PCA analize sa rezultatima kvantitativne analize fenolnih komponenti izdvojilo se nekoliko jedinjenja kojom svojom kvantitativnom varijabilnošću pokazuju zasebnost te na taj način opisuju karakteristiku pojedinih taksona na nivou vrsta unutar jednog roda, kao i između rodova obostrano. Izuzetno visok sadržaj 5-*O*-kafeoilhinske kiseline je karakterističan za herbe *Urtica* vrsta, dok je prisustvo flavan-3-ola – epikatehina – registrovano samo u korenju *Parietaria* vrsta. Dodatno, lignan sekoizolaricirezinol je karakterističan samo za koren vrste *U. dioica*, dok su viteksin, luteolin-7-*O*-glukozid i hiperozid identifikovani isključivo u herbi vrste *U. kioviensis*. Rutin je dominantna komponenta u herbama *Parietaria* vrsta, druga po sadržaju u herbama vrste *U. dioica* a predstavlja negativni taksonomski marker za vrstu *U. kioviensis* jer nije ni detektovana u njenim ekstraktima. Distribucija fenolnih komponenti u vrstama roda *Urtica* je bila sledeća: najveći sadržaj je određen u ekstraktima cveta (do 9,5 % SE), zatim ekstraktima herbi i lista (3,73 % i 3,60 %), stabljike (1,39 % SE) i kao najsiromašniji ekstrakt korena sa svega 0,05 % SE. Kod *Parietaria* vrsta, neočekivano ekstrakti stabljika imaju visok sadržaj fenola – do 2,73 % SE. Slede ekstrakti herbi (do 2,46 % SE), cveta (do 2,46 %) i lista (do 1,75 % SE). Takođe neočekivano visok sadržaj fenola je kvantifikovan u ekstraktima korena *Parietaria* vrsta – do 1,44 % SE, sa najvećim udelom flavan-3-ola.

❖ Antioksidantni potencijal metanolnih i vodenih ekstraktata herbi, korena i lista ispitivanih vrsta je određen njihovom sposobnošću da neutrališu sledeće radikale *in vitro*: DPPH[•], NO[•], SOA i [•]OH radikal kao i testom inhibicije lipidne peroksidacije a FRAP testom je procenjena redukciona sposobnost ekstraktata. U većini testova za procenu antioksidantnog potencijala ispitivanih ekstraktata kao najbolji su se izdvojili metanolni ekstrakti korena vrsta roda *Parietaria*. Ovi ekstrakti su imali najniže IC₅₀ vrednosti u

testovima neutralizacije DPPH[•] i SOA radikala kao i inhibicije lipidne peroksidacije. Ispoljili su najveći redukcionni kapacitet odredivan FRAP testom. Poređenjem aktivnosti vrsta roda *Urtica*, kao aktivnija pokazala se manje poznata vrsta *U. kioviensis*. Ekstrakti herbe i lista ove vrste bili su uspješni u neutralizaciji DPPH[•], SOA i NO[•] radikala, a ispoljili su i veći redukcionni kapacitet. Interesantno je da su infuzi ili vodeni ekstrakti nadzemnih organa (herbe i lista), pored niskog sadržaja fenolnih jedinjenja, pokazali veoma sličnu ili malo manju antioksidantnu aktivnost u odnosu na metanolne ekstrakte istih vrsta. Čak su testu neutralizacije OH radikala bili 2,7 - 9,3 puta uspješni u odnosu na odgovarajuće metanolne ekstrakte.

❖ Antiinflamatorna aktivnost ispitivana je praćenjem uticaja metanolnih i vodenih ekstrakata herbi i korena ispitivanih vrsta na produkciju metabolita arahidonske kiseline u COX-1 i 12-LOX putu u trombocitima, pomoću LC-MS/MS tehnike. Većina ispitivanih ekstrakata je pokazala dozno-zavisnu inhibiciju produkcije četiri praćena metabolita: 12-HHT, TXB₂ i PGE₂ za COX granu i 12-HETE za LOX granu. Kao najaktivniji ekstrakt se istakao ekstrakt korena *P. officinalis* sa IC₅₀ vrednostima za enzime COX grane u osegu 0,08 - 0,84 mg/mL a za LOX granu 1,32 mg/mL. Stoga se može zaključiti da je ovaj ekstrakt doveo do inhibicije i samog enzima fosfolipaze A. Ekstrakti korena vrsta roda *Parietaria* su se pokazali kao veoma dobri inhibitori TX sintaze i u manjoj meri PGE sintaze. Što se tiče vrste *U. kioviensis*, njen ekstrakt herbe nije uticao na COX metabolički put ali jeste znatno smanjio produkciju 12-HETE metabolita LOX grane. Ipak, mnogo aktivniji se pokazao ekstrakt korena ove vrste koji je veoma dobro inhibirao enzim TX sintazu a nešto slabije i PGE sintazu kao i 12-LOX enzim. Metanolni ekstrakti herbe koprive su u najvećoj meri smanjili upravo LOX-zavisnu produkciju metabolita 12-HETE, dok su bili mnogo slabiji inhibitori COX metaboličkog puta (slaba inhibicija TX sintaze i zanemarljiv uticaj na PGE sintazu). Kao mnogo bolji inhibitori enzima TX sintaze su se pokazali ekstrakti korena koprive. Infuzi herbe koprive pripremljeni po recepturi za čajeve su znatno smanjili produkciju sva četiri praćena metabolita. Ovi rezultati ukazuju da je došlo do inhibicije oba enzima (COX-1 i 12-LOX) ali možda čak i inicijalnog enzima ovog metaboličkog puta - fosfolipaze A. Na ovaj način je, još jednom, opravdana dugogodišnja upotreba čajeva od koprive u terapiji upalnih procesa.

❖ Uticaj metanolnih ekstrakata herbi i korena ispitivanih vrsta na enzim acetilholinesterazu je određen po metodi sa Ellmanovim reagensom. Svi ispitivani ekstrakti su uspeli da smanje aktivnost ovog enzima – opseg inhibicije 36 % - 95 %, pri radnim koncentracijama od 1 mg/mL. Kao bolji inhibitori ovog enzima kod svih ispitivanih vrsta su se pokazali ekstrakti korena u odnosu na ekstrakte herbi. Ekstrakti korena svih vrsta roda *Parietaria* su postigli izuzetno visokou inhibiciju (opseg: 77 - 95 %) dok se iz roda *Urtica* po sposobnosti inhibicije ovog enzima istakao ekstrakt korena vrste *U. kioviensis* (92 %).

❖ Ispitan je imunomodulatorni uticaj sedam odabranih metanolnih ekstrakata: *U. dioica* - herba i koren, *P. officinalis* - herba i koren, *P. judaica* - herba i koren i *P. lusitanica* – herba na ćelijskim linijama IEC18 (intestinalne epitelne ćelije pacova) i Caco2 (humane ćelije kolonorektalnog adenokarcinoma) kao model sistemima epitela gastrointestinalnog trakta. Određen je uticaj ekstrakata na produkciju citokina (rat MCP1, GRO α) u bazalnim uslovima i u uslovima LPS-indukovane inflamacije IEC18 ćelija kao i signalni putevi preko kojih ekstrakti deluju. Ispitan je i uticaj ekstrakata na ekspresiju COX-2 u uslovima inflamacije izazvane LPS-om. Proliferativni efekat ekstrakta herbe i korena vrste *P. officinalis* je ispitivan u eksperimentu epitelizacije "rane" IEC18 ćelija. Uticaj ova dva ekstrakta na diferencijaciju Caco2 ćelija je ispitivan određivanjem nivoa ekspresije proteina PCNA i vilina. Određen je uticaj svih ekstrakata na obrazac sekrecije citokina humanog MCP1 i IL-8.

Ekstrakti korena *Parietaria* vrsta su povećali sekreciju citokina rat MCP1 i GRO α i u bazalnim i u uslovima LPS-stimulacije i utvrđeno je da ispoljavaju sinergistički efekat sa LPS-om, povećavajući sekreciju znatno iznad sume individualnih efekata. Suprotno tome, ekstrakti koprive su povećali bazalnu a smanjili LPS-om indukovanu sekreciju citokina rat MCP1. Ovakvo dejstvo čini ga veoma pogodnim da povećava steady-state odbranu organizma u gastrointestinalnom traktu a sa druge strane, sprečava

prekomernu produkciju proinflammatoryh agenasa i oštećenja koja mogu nastati kao posledica hroničnih inflamacija. Ekstrakti herbi vrsta *P. officinalis* i *P. judaica* nisu značajno menjali sekreciju ni jednog citokina (vrednosti veoma bliske kontroli) ni u bazalnim ni u uslovima inflamacije.

Za ekstrakte (*U. dioica* – herba i koren, koren vrsta *P. officinalis* i *P. judaica* i *P. lusitanica* – herba) koji su menjali obrazac sekrecije ova dva citokina, utvrđeno je preko kojih signalnih puteva deluju, odnosno, sa kojim signalnim molekulama i receptorima intereaguju. Svih pet ekstrakata svoje dejstvo ispoljava preko adapternog proteina MyD88 (ali ne i preko TLR4 receptora), kao i preko NF- κ B signalnog puta. Neki ekstrakti ispoljavaju svoje dejstvo intereagujući sa MAP kinazama (p38 i JNK) ali u mnogo manjem intenzitetu.

Uticaj ekstrakata na LPS-om indukovanu ekspresiju COX-2 enzima u IEC18 ćelijama, utvrđen je metodom Western blota. Drastične promene ekspresije ovog enzima su izazvali ekstrakti korena vrsta *U. dioica* i *P. officinalis*. Povećanje ekspresije COX-2 od 145% u odnosu na sam LPS je izazvao ekstrakt korena vrste *P. officinalis* što je u saglasnosti sa njegovim proinflammatorym efektom povećavanja sekrecije citokina rat MCP1 i GRO α . S druge strane, ekstrakt korena vrste *U. dioica* je smanjio ekspresiju COX-2 na 57% od samog LPS-a, čime je potvrđeno antiinflammatoryno dejstvo korena koprive. Ekstrakti herbi vrsta *U. dioica* i *P. lusitanica* ne menjaju LPS-om indukovanu ekspresiju ovog enzima, a ekstrakti *P. officinalis* - herba, *P. judaica* - herba i koren je tek blago smanjuju.

Proliferativni efekat ispitivanih metanolnih ekstrakata je određivan kvantifikacijom PCNA (eng. *proliferating cell nuclear antigen*) odnosno, proliferativnog antigena. Najizraženiji proliferativni efekat su ispoljili ekstrakti herbe a naročito korena vrste *P. officinalis* koji su dozno-zavisno povećali ekspresiju ovog proteina. Ekstrakt korena vrste *P. officinalis* je, pri koncentraciji od 50 μ g/mL čak 9 puta povećao ekspresiju PCNA u odnosu na kontrolu. Ovi rezultati ukazuju na izuzetan proliferativni uticaj ekstrakata herbi i korena vrste *P. officinalis* te je ispitan njihov uticaj direktno na narušenom monosloju IEC18 ćelija posmatrajući brzinu migracije i proliferacije ćelija do ponovnog uspostavljanja monosloja. Dejstvom ekstrakta korena došlo je do porasta epitelizacije od 26,4 %, a dejstvom ekstrakta herbe od 22,5 % u odnosu na kontrolu. Proliferativni efekat ili efekat zarastanja rane (eng. *wound healing*) ovih ekstrakata se može iskoristiti u terapijama oporavka sluznice intestinuma.

Određen je uticaj svih sedam odabranih metanolnih ekstrakata na obrazac LPS-om indukovane sekrecije citokina hMCP1 i IL-8 iz Caco2 ćelija. Sekreciju hMCP1 su povećali ekstrakti herbi vrsta *U. dioica*, *P. judaica* i *P. lusitanica* i to u dozno-zavisnom maniru. Ostali ekstrakti jesu povećali sekreciju ovog citokina ali u znatno manjem obimu i ne primećuje se dozno-zavisni uticaj. Najizrazitiji uticaj na sekreciju hemokina IL-8 ispoljio je ekstrakt herbe koprive. Naime, ovaj ekstrakt je dozno-zavisno smanjio sekreciju ovog proinflammatorynog hemokina i to na 59 % u odnosu na LPS-om izazvanu sekreciju, pri radnoj koncentraciji od 100 μ g/mL.

Uticaj ekstrakata herbi i korena *P. officinalis* na proliferaciju Caco2 ćelija je utvrđen kvantifikacijom proteina PCNA i vilina. Ovi ekstrakti nisu značajno uticali na ekspresiju proliferativnog antigena što je suprotno efektima koje su ovi ekstrakti ispoljili na IEC18 ćelijama. Međutim, ekstrakt korena je povećao ekspresiju proteina vilina u ćelijama neposredno pre i za vreme konfluencije i to za 60% u odnosu na kontrolu. Ekstrakt herbe iste vrste jeste povećao ekspresiju ali za svega 20%. Ovi rezultati se mogu protumačiti time da su ekstrakti, naročito ekstrakt korena, stimulisali reorganizaciju ćelijskog skeleta. Pošto nije došlo do intenziviranja ćelijske deobe, može se zaključiti da su ekstrakti stimulisali ćelijsku migraciju ali ne i proliferaciju.

❖ Poznato je da izloženost vazdušnom zagađenju ima negativan uticaj na fiziološke parametre i biološki potencijal lekovitih biljaka te one mogu služiti kao dobri bioindikatori zagađenja. U ovom radu je određen je uticaj vazdušnog zagađenja na fiziološke parametre, akumulaciju teških metala i biološku aktivnost koprive (*U. dioica*) kao široko rasprostranjene i lako prepoznatljive biljne vrste. Na

osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da kopriva ne predstavlja dobar bioindikator zagađenja životne sredine teškim metalima jer ne vrši njihovu akumulaciju, čak ni u zagađenoj sredini. S druge strane, ovo znači da je njena upotreba bezbedna bez obzira u kakvoj sredini raste, što opravdava poverenje narodne medicine u ovu biljku. Ipak, fiziološki parametri su bili znatno lošiji kod biljke izložene vazdušnom zagađenju (niži intenzitet fotosinteze i efikasnosti korišćenja vode, niži sadržaj fotosintetičkih pigmenata), kao i njen biološki potencijal (niža antioksidantna i antiinflamatorna aktivnost, niži sadržaj fenolnih jedinjenja) što treba imati u vidu prilikom odabira biljnog materijala za primenu u fitoterapiji.

❖ Sumiranjem dobijenih rezultata može se zaključiti da su odabrane vrste tribusa *Urticeae* i *Parietarieae* bogati izvori biološki aktivnih jedinjenja koja ispoljavaju raznovrsne biološke aktivnosti. Sa hemotaksonomskog aspekta izdvajaju se sledeća jedinjenja kao potencijalni taksonomski markeri: viši sadržaj 5-*O*-kafeoilhinske kiseline u ekstraktima herbi vrsta roda *Urtica*, i visok sadržaj flavan-3-ola u ekstraktima korena vrsta roda *Parietaria*. Ekstrakt herbe vrste *U. kioviensis* se od ostalih izdvaja po tome što ne sadrži rutin a sadrži *C*-glikozide, u najvećoj meri viteksin a koren vrste *U. dioica* po tome što sadrži lignene (derivate sekoizolaricirezinola i neoolivila). Od svih ispitivanih ekstrakata, ekstrakti korena *Parietaria* vrsta su ispoljili najbolji antioksidantni potencijal u većini izvršenih testova. Najsnažniji antiinflamatorni potencijal je ispoljio ekstrakt korena vrste *P. officinalis* a prate ga ekstrakti korena vrsta roda *Urtica*. Veoma dobar antiinflamatorni potencijal su ispoljili infuzi herbi vrste *U. dioica* (čajevi od koprive). Svi ispitani metanolni ekstrakti su ispoljili odličnu inhibiciju enzima acetilholinesteraze a kao najbolji se izdvajaju ekstrakti korena *Parietaria* vrsta i vrste *U. kioviensis*. Povećanu sekreciju citokina rat MCP1 i GRO α iz IEC18 ćelija izazivaju ekstrakti korena vrsta *P. officinalis* i *P. judaica* u bazalnim uslovima i uslovima LPS-stimulisanе inflamacije, dok ekstrakti vrste *U. dioica* povećavaju bazalnu a smanjuju LPS-stimulisanu sekreciju rat MCP1. Stimulaciju sekrecije ova dva citokina, ispitivani ekstrakti vrše interakcijom sa adaptivnim proteinom MyD88 (ali ne i preko TLR4 receptora) i NF- κ B signalnim putem. Ekstrakt korena vrste *P. officinalis* povećava LPS-om indukovanu ekspresiju enzima COX-2 u IEC18 ćelijama, dok je ekstrakt korena vrste *U. dioica* smanjuje. Efekat epitelizacije ili zarastanja rane na monosloju IEC18 ćelija ispoljavaju ekstrakti herbe i korena vrste *P. officinalis*. Ispitivani ekstrakti ne menjaju značajno sekreciju citokina hMCP1 i IL-8 u Caco2 ćelijama niti ispoljavaju značajan uticaj na njihovu proliferaciju.

6. Summary

❖ The plant species belonging to the Urticeae and Parietarieae tribe, more specifically to the *Urtica* and *Parietaria* genera, have been present in a human diet and in a traditional medicine since ancient times. The present doctoral thesis expands the knowledge about the chemical composition and biological activities of the following plant species: *U. dioica* subsp. *dioica* var. *pubescens*, *U. dioica* subsp. *dioica* var. *dioica*, *U. kioviensis*, *P. officinalis*, *P. lusitanica* subsp. *lusitanica*, *P. judaica* subsp. *judaica* i *P. serbica*. In spite of the fact that the mentioned species have been used as medicinal plants, only *Urtica dioica* (stinging nettle) was the subject of numerous scientific researches. Therefore, the aim of the present doctoral thesis was to provide the information on chemical profile of the selected plant species extracts, their antioxidant and anti-inflammatory activity, effect on the activity of acetylcholinesterase, as well as their effects on the immune response and proliferation of the intestinal epithelial cells.

❖ Phytochemical characterisation included: LC-DAD-MS and LC-MS-MS qualitative analysis of methanol extracts, LC-MS-MS quantitative analysis of selected phenolic compounds in methanol and aqueous extracts, as well as total phenolics and flavonoids, that were determined spectrophotometrically. PCA analysis was done with the results obtained by LC-MS-MS quantitative analysis in order to define potential chemotaxonomic markers for the investigated species. Biological potential of methanol and aqueous extracts was assessed by antioxidant, anti-inflammatory and anti-acetylcholinesterase assays. Furthermore, the immuno-modulatory effects of the selected methanol extract on the immune response and proliferation of intestinal epithelial cells (IEC18 and Caco2) was evaluated.

❖ Using chromatographic techniques LC-DAD-MS and LC-MS/MS, the qualitative analysis of the methanol extracts of herbs and roots was performed. In total 164 compounds were detected, 61 of them identified belonging to the following groups: phenolic acids, flavonoid glycosides, lignans, aminoacyl-conjugates and compounds named according to their molecular weight as $M_w = 310-330$ compounds. Phenolic acids were more abundant in the herb extracts of the *Urtica* species. In the root extract of the *U. dioica*, the caffeic acid derivative – *N*-caffeoyl-*L*-DOPA (clovamide) was identified for the first time. Flavonoid glycosides were more abundant in the herb extracts in all the examined species. However, the only identified aglycon – epicatechin – was present in the root extracts of the *Parietaria* species. The most dominant glycosides were the glycosides of quercetin, kaempferol, luteolin and isorhamnetin. The species *U. kioviensis* differs from the rest of the investigated ones by having three *C*-glycosides identified in the herb extract while lacking rutin, which is one of the two most dominant compounds in the remaining species. Lignans were identified only in the *U. dioica* root extract as derivatives of secoisolariciresinol and neo-olivil. The great number of the compounds named aminoacyl-conjugates were identified exclusively in the extracts of *Parietaria* species, predominantly in the root extracts.

❖ The content of 44 selected phenolic compounds and quinic acid was determined by LC-MS/MS in herb, root, leaf, inflorescence and stem extracts from all the examined species. In the herb extracts 16 compounds were detected in *Urtica* species and 15 in *Parietaria* species, in root extracts 10 and 13 (respectively); in leaf extracts 16 and 14; in stem extracts 11 and 12 and in inflorescence extracts 14 and 15 compounds of the 45 examined. The results of the PCA analysis pointed out several compounds as potential chemotaxonomic markers for the investigated species. High content of 5-*O*-caffeoylquinic acid is a characteristic for the *Urtica* herbs, while the presence of flavan-3-ol – epicatechin – is registered only in the *Parietaria* roots. Additionally, lignan secoisolariciresinol is specific for *U. dioica* root. Species *U. kioviensis* can be separated from the rest of the examined species by the presence of glycosides vitexin, luteolin-7-*O*-glucoside and hyperoside and complete absence of rutin. This is very significant because rutin is the dominant compound in *Parietaria* herbs and second dominant in *U. dioica* herbs. Therefore, rutin can be a negative marker for the *U. kioviensis*. Distribution of the phenolic compounds in the plant parts differs among *Urtica* and *Parietaria* species. The highest phenolic content in *Urtica* species was determined in the inflorescence extracts (up to 9.5 % DW – dry weight), followed by herb and leaf extracts (3.73 % and 3.60 % DW), than stem extracts (1.39 % DW) and root extracts with the lowest phenolic content – only 0.05 % DW. Unexpectedly, in the case of *Parietaria* species, stem extracts are the richest in

phenols – up to 2.73 % DW. followed by extracts of herb (up to 2.46 % DW), inflorescence (2.46 % DW) and leaf (1.75 % DW). Not so common is the high phenolic content determined in root extracts of *Parietaria* species – up to 1.44 % DW, with the highest share of flavan-3-ols.

❖ Antioxidant potential of methanol and aqueous extracts of herbs, roots and leaves of the investigated species was determined by their ability to neutralise DPPH[•], NO[•], SOA i [•]OH radicals *in vitro* and inhibit the lipid peroxidation. Reducing ability of the extracts was evaluated by FRAP assay. The methanol root extracts of *Parietaria* species expressed strong scavenging capacity towards DPPH[•] and SOA radicals and the highest ability to inhibit lipid peroxidation. The same extracts had the highest reducing capacity indicating the presence of compounds with high reducing potential. Comparing the activity of the *Urtica* species, the more active was less known *U. kioviensis*. Herb and leaf extract of this plant were more successful in neutralising DPPH[•], NO[•] and SOA radicals, and exhibited higher reducing capacity. Interestingly, aqueous extracts of aerial parts have shown very similar or slightly reduced antioxidant activity with respect to the methanol extracts of the same plant. In the OH assay aqueous extracts have even exhibited 2.7 – 9.3 times higher activity than the respective methanol extracts.

❖ Anti-inflammatory activity was evaluated by monitoring the effect of the extracts on COX-1 and 12-LOX branches enzymes of arachidonic acid metabolic pathway in human platelets, using the LC-MS/MS technique. The majority of methanol and aqueous extracts showed dose-dependent inhibitory activity on production of 12-HHT, TXB₂, PGE₂ and 12-HETE. As the most active extract stands out *P. officinalis* – root extract with IC₅₀ values for the COX branch in the range from 0.08 to 0.84 mg/mL, and 1.32 mg/mL for the LOX branch. This indicates that the mentioned extract might have inhibited the initial enzyme of the arachidonic acid metabolic pathway – phospholipase A. Root extracts of *Parietaria* species were very good inhibitors of TX synthase and to a lesser extent of PGE synthase. Stinging nettle methanol herb extracts decreased LOX-dependent production of 12-HETE, but were not very good inhibitors of the COX branch enzymes. The more potent inhibitors of the TX synthase were stinging nettle root extracts. The aqueous extracts prepared as the herbal teas have significantly lower the production of all four quantified metabolites. The results indicate that the aqueous extracts might have inhibited both COX-1 and 12-LOX, even phospholipase A. With these results it is once more justified the usage of stinging nettle teas in the treatment of the inflammatory diseases.

❖ The effect of the methanol herb and root extracts on the activity of acetylcholinesterase was evaluated according to the modified Ellman procedure. All the examined extracts (at the concentration of 1 mg/mL) have inhibited the acetylcholinesterase in the inhibition range from 36 % to 95 %. The highest inhibition have exhibited the root extracts of the *Parietaria* species (ranging from 77 % to 95 %) and *U. kioviensis* (92 %). In cases of the all investigated species, the root extracts were better inhibitors of acetylcholinesterase than the herb extracts of the same specie.

❖ The immunomodulatory effects of the seven selected methanol extracts (*U. dioica* – herb and root, *P. officinalis* – herb and root, *P. judaica* – herb and root and *P. lusitanica* – root) was evaluated using cell lines IEC18 and Caco2 as models of the gastrointestinal epithelium. The effects of extracts on cytokine (rat MCP1, GRO α) secretion by IEC18 cells was determined, in the normal condition and when coadministered with LPS. A pharmacological analysis was performed to identify the signaling pathways responsible for the effects observed in rat MCP1/ GRO α secretion. Furthermore, the effect of extracts on COX-2 expression in LPS-stimulated IEC18 cells was determined. Proliferative effect of *P. officinalis* herb and root extracts was evaluated in the wound healing experiment on IEC18 cell line. The influence of the same two extracts on Caco2 cells differentiation was determined by quantifying PCNA and villin expression. The effect of seven selected extracts on the production of human MCP1 and IL-8 by Caco2 cells was evaluated.

The *Parietaria* root extracts have increased the secretion of both rat MCP1 and GRO α , in non-stimulated and LPS-stimulated conditions. These extracts and LPS had synergistic effects, since both

cytokine levels were higher than the sum of their individual effects. Opposite to that, the stinging nettle extracts (herb and root) have increased non-stimulated but decreased LPS-stimulated secretion of rat MCP1. This effects makes the stinging nettle extracts suitable to increase steady-state defence in the gastrointestinal tract, and, on the other hand, prevents the overproduction of proinflammatory agents and tissue damage as a consequence of chronic inflammatory diseases. The herb extracts of *P. officinalis* and *P. judaica* have not altered the secretion of the mentioned cytokines, in the non-stimulated and LPS-stimulated conditions.

In order to identify the signaling pathways responsible for the observed effects of the extracts (*U. dioica* – herb and root, root extracts of *P. officinalis* and *P. judaica* and *P. lusitanica* – herb) on cytokine production in IEC18 cells a pharmacological analysis was conducted. The effects of all five extracts on rat MCP1/GRO α secretion were dependent primarily on MyD88 (but not on TLR4) and NF- κ B signaling, and to a lesser extent of MAPK (p38 and JNK).

The effect of seven selected extracts on LPS-stimulated COX-2 expression in IEC18 cells was performed. Drastic changes in the COX-2 expression have caused the root extracts of *U. dioica* and *P. officinalis*. The root extract of *P. officinalis* have increased the COX-2 expression (145 % of the LPS alone effect), and it is in accordance with its proinflammatory effect proven in the previous experiment (increased rat MCP1/GRO α secretion). On the other hand, *U. dioica* root extract have decreased LPS-stimulated COX-2 expression (57 % of the LPS alone effect), proving its anti-inflammatory effect. The herb extracts of *U. dioica* and *P. lusitanica* have not altered LPS-stimulated COX-2 expression in IEC18 cells, while the *P. officinalis* herb extracts and herb and root extract of *P. judaica* have decreased it.

Proliferative effect of the tested seven extracts is determined by quantification of proliferating cell nuclear antigen (PCNA). The dramatic proliferative effect have exhibited *P. officinalis* herb, and particularly, root extract by increasing the expression of this protein in a dose-dependent manner. *P. officinalis* root extract, at the concentration of 50 μ g/mL, have increased the PCNA expression 9 times higher compared to the control. This results indicate a remarkable proliferative effect of the *P. officinalis* herb and root extracts. Therefore, their wound healing properties *in vitro* have been evaluated directly on the IEC18 cells. Both extracts have enhanced cell migration and proliferation, the root extract 26,4 % more and herb extract 22,5 % more than in the control. The wound-healing properties of this two extracts makes them a great potential therapeutic agent for the treatment of intestinal injuries.

The effect of seven selected extracts on LPS-stimulated secretion of hMCP1 and IL-8 in Caco2 cells was determined. Secretion of hMCP1 have increased herb extracts of *U. dioica*, *P. judaica* and *P. lusitanica* in a dose-dependent manner. The extract of *U. dioica* herb have decreased IL-8 secretion in a dose-dependent manner. The remaining extracts have not altered the secretion of these cytokines significantly.

The effect of *P. officinalis* herb and root extracts on Caco2 cells proliferation was evaluated by quantifying PCNA and villin. The tested extracts have not altered PCNA expression in Caco2 cells, opposite to the effect shown on IEC18 cells. However, the root extract have increased villin expression 60 %, and herb extract 20 % more than in the control. These results indicate that the tested extracts have stimulated the reorganisation of the cytoskeleton and cell migration, but not its proliferation.

❖ Plants quickly react to chemical changes in the environment and are affected by wide array of air, water and soil pollutants, that makes them a good candidates for a pollution bio-indicators. In this thesis, the influence of air pollution on physiological parameters, heavy metal accumulation and biological activity of stinging nettle (*U. dioica*) was determined. This plant specie was chosen because it is widely distributed and easily recognisable. The physiological parameters (the stomatal conductivity, photosynthesis and transpiration rates) were considerably lower in samples from contaminated site. However, the content of plant phenolic is lowered as well as extracts' antioxidant and anti-inflammatory activity. Based on the

results obtained, it can be concluded that the stinging nettle is not a good bioindicator of heavy metal contamination by air pollution. On the other hand, this indicates that the stinging nettle is safe for human consumption even if it grows on the polluted locality. However, the physiological parameters were much lower in the air pollution exposed plant as well as her biological potential. In conclusion, air pollution does not affect the safety of nettle as medicinal plant, but it does negatively affect its biological activity.

❖ The obtained results suggest that the examined species of the Urticeae and Parietarieae tribe (genera *Urtica* and *Parietaria*) are abundant with the biologically active compounds that express a broad spectrum of biological activities. As a potential chemotaxonomic markers stand out the following compounds: 5-*O*-caffeoylquinic acid (highly abundant in the herb extracts of the *Urtica* spp.) and epicatechin (highly abundant in the root extracts of the *Parietaria* spp.). *U. kioviensis* herb extracts differs from the rest by high content of vitexin and total lack of rutin. The best antioxidant potential have exhibited the root extracts of the *Parietaria* species. The strongest anti-inflammatory potential had the root extract of the *P. officinalis*, followed by root extracts of the *Urtica* spp. Excellent anti-inflammatory activity have exhibited the aqueous extracts of *U. dioica* herbs – stinging nettle teas. All tested methanol extracts have inhibited enzyme acetylcholinesterase, the best inhibitors being root extracts of *U. kioviensis* and *Parietaria* species. Root extracts of *P. officinalis* and *P. judaica* have increased the basal and LPS-stimulated secretion of rat MCP1 and GRO α , while *U. dioica* extracts increased the basal but decreased the LPS-stimulated secretion. The examined extracts interact with the MyD88 (but not the TLR4) and NF- κ B signaling pathway. The root extract of *P. officinalis* increase LPS-stimulated expression of COX-2 in IEC18 cells, while the root extract of *U. dioica* decreases it. The wound healing effect exhibit the herb and root extract of *P. officinalis*. Investigated extracts do not significantly alter the secretion of hMCP1 and IL-8 in Caco2 cells and exhibit no significant effect to their proliferation.

7. Literatura

- Abbas A.K., Lichtman A.H. (2006-2007) Osnovna imunologija - funkcionisanje i poremećaji imunskog sistema, drugo obnovljeno izdanje, Data status, Beograd, Srbija. .
- Adhikari, A., Xu, M., Chen, Z.J. (2007). Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene*, 26, 3214–3226.
- Ahn, K.S., Jung, K.Y., Kim, J.H., Oh S.R., Lee, H.K. (2001). Inhibitory activity of lignan components from the flower buds of *Magnoliae fargesii* on the expression of cell adhesion molecules. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24, 1085-1087.
- Akerreta, S. (2009). Etnobotánica farmacéutica en Navarra: del uso tradicional de las plantas medicinales a su evidencia científica (Ph.D.thesis). Faculty of Science, University of Navarra Pamplona, Spain, 831.
- Akerreta, S., Calvo, M.I., Cavero, R.Y. (2013). Sabiduría popular y plantas curativas. Ediciones I (Integralia la casa natural, S.L.), Madrid.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783–801.
- Alonso, D., Dorronsoro, I., Rubio, L., Munoz, P., Garcia-Palomero, E., Del Monte, M., Bidon-Chanal, A., Orozco, M., Luque, F.J., Castro, A., Medina, M., Martinez, A. (2005). Donepezil–tacrine hybrid related derivatives as new dual binding site inhibitors of AChE. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 13, 6588–6597.
- Amako, K., Chen, G., Asada, K. (1994). Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant and Cell Physiology*, 35, 497–504.
- American Herbalists Guild. (2004). AHG professional member survey: *Urtica dioica* leaf. Unpublished. Available from: American Herbal Pharmacopeia.
- Andújar, I., Ríos, J.L., Giner, R.M., Recio, M.C. (2013). Shikonin promotes intestinal wound healing *in vitro* via induction of TGF- β release in IEC-18 cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49, 637–641.
- Anglister, L., Stiles, J.R., Salpeter, M.M. (1994). Acetylcholinesterase density and turn over number at frog neuromuscular junction, with modeling of their role in synaptic function. *Neuron*, 12, 783-794.
- Anisowicz, A., Bardwell, L., Sager, R. (1987). Constitutive overexpression of a growth-regulated gene in transformed Chinese hamster and human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, 7188–7192.
- Annapurna, A., Reddy, C.S., Akondi, R.B., Rao, S.R.C. (2009). Cardioprotective actions of two bioflavonoids, quercetin and rutin, in experimental myocardial infarction in both normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61, 1365–1374.
- Antonopoulou, S., Demopoulos, G.C., Andrikopoulos, N.K. (1996). Lipid separation from *Urtica dioica*: existence of platelet-activating factor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3052-3056.
- Arce, M.P., Rodriguez-Franco, M.I., Gonzalez-Munoz, G.C., Perez, C., Lopez, B., Villarroja, M., Lopez, M.G., Garcia, A.G., Conde, S. (2009). Neuroprotective and Cholinergic Properties of Multifunctional Glutamic Acid Derivatives for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52, 7249-7257.
- Arlorio, M., Locatelli, M., Travaglia, F., Coisson, J.D., Del Grosso, E., Minassi, A., Appendino, G., Martelli, A. (2008). Roasting impact on the contents of clovamide (N-caffeoyl-L-DOPA) and the antioxidant activity of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Food Chemistry*, 106, 967–975.

- Artursson, P. (1991). Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 8, 305-330.
- Aruoma, O.I. (1994). Deoxyribose assay for detecting hydroxyl radicals. *Methods in Enzymology*, 233, 57–66.
- Asgary, S., Naderi, G., Sarrafzadegan, N., Ghassemi, N., Boshtam, M., Rafie, M., Arefian, A. (1999). Anti-oxidant effect of flavonoids on hemoglobin glycosylation. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 73, 223–226.
- Avcı, G., Kupeli, E., Eryavuz, A., Yesilada, E., Kucukkurt, I. (2006). Antihypercholesterolaemic and antioxidant activity assessment of some plants used as a remedy in Turkish folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 107, 418-423.
- Ayres, D., Loike, J.D. (1990). Chemistry and pharmacology of natural products. Lignans: chemical, biological and clinical properties, Cambridge University Press, Cambridge.
- Baba, S., Furuta, T., Horie, M., Nakagawa, H. (1981). Studies on drug metabolism by use of isotopes. XXVI. Determination of urinary metabolites of rutin in humans. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70, 780–782.
- Baggiolini, M., Clark-Lewis, I. (1992). Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Letters*, 307(1), 97-101.
- Baggiolini, M., Walz, A., Kunkel, S.L. (1989). Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *Journal of Clinical Investigation*, 84, 1045-1049.
- Baily, C.A., Bryla, P., Malick, A.W. (1996). The use of intestinal epithelial cell culture model, Caco-2, in pharmaceutical development. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 22, 85-103.
- Ball P.W. (1996). *Parietaria* L., u Tutin T.G., Burges N.A., Chater A.O., Edmondson J.R., Heywood V.H., Moore D.M., Valentine D.H., Waters S.M., Webb D.A., uredn., Flora Europaea 2nd. ed., I: 80 - 81. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ball P.W., Geltman D.V. (1996). *Urtica* L., u Tutin T.G., Burges N.A., Chater A.O., Edmondson J.R., Heywood V.H., Moore D.M., Valentine D.H., Waters S.M., Webb D.A., uredn., Flora Europaea 2nd. ed., I: 79 - 80. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bao-Ning, S., William, P. J., Muriel, C., Leonardus, B. S. K., Rachman, I., Soedarsono, R., Harry, H. S. F., Norman, R. F., John, M. P., Kinghorn, A. D. (2004). Constituents of the stems of *Macroccoccus pomiferus* and their inhibitory activities against cyclooxygenases-1 and -2. *Phytochemistry*, 65, 2861–2866.
- Barlow, R.B., Dixon, R.O.D. (1973). Choline acetyltransferase in the nettle *Urtica dioica* L. *Biochemical Journal*, 132, 15–18.
- Barry, M.J., Fowler Jr., F.J., O’Leary, M.P., Bruskewitz, R.C., Holtgrewe, H.L., Mebust, W.K., Cockett, A.T. (1992). The American Urological Association symptom index for benign prostatic hyperplasia. The Measurement Committee of the American Urological Association. *Journal of Urology*, 148, 1549–1557.
- Bartolucci, C., Perola, E., Pilger, C., Fels, G., Lamba, D. (2001). Threedimensional structure of a complex of galanthamine (Nivalin) with acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: Implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Proteins*, 42, 182-191.
- Bartsch, W., Kuhne, G. (1992). Hemmung der Aromatase durch 9-hydroxy-10-trans-12-cis-Octadecadiensäure. In: Rutishauser, G. (Ed.), Benigne Prostatahyperplasie III. Klinische und Experimentelle Urologie, vol. 22. W. Zuckschwerdt, New York.

- Basly, J.P., Lavier, M.C. (2005). Dietary phytoestrogens: potential selective estrogen enzyme modulators? *Planta Medica*, 71, 287-294.
- Bauer, H.W., Sudhoff, F., Dressler, S. (1988). Endokrine Parameter während der Behandlung der benignen Prostatahyperplasie mit ERU. In: Bauer, H.W. (Ed.), *Benigne Prostatahyperplasie II. Klinische und Experimentelle Urologie*, vol. 19. W Zuckschwerdt, New York..
- Beara, I., Orčić, D., Lesjak, M., Mimica-Dukić, N., Peković, B., Popović, M. (2010). Liquid chromatography/tandem mass spectrometry study of anti-inflammatory activity of plantain (*Plantago L.*) species. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 52, 701–706.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.
- Bergmann, M., Hart L., Lindsay, M., Barnes, P.J., Newton, R. (1998). I κ B α degradation and NF- κ B DNA binding are insufficient for IL-1 β and TNF- α -induced κ B-dependent transcription. Requirement for an additional activation pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 6607–6610.
- Birks, J. (2006). Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1, CD005593.
- Bnouham, M., Merhfour, F.Z., Ziyyat, A., Mekhfi, H., Aziz, M., Legssyer, A. (2003). Antihyperglycemic activity of the aqueous extract of *Urtica dioica*. *Fitoterapia*, 74, 677–681.
- Bokkenheuser, V.D., Shackleton, C.H., Winter, J. (1987). Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal bacteriodes from humans. *Biochemical Journal*, 248, 953–956.
- Bombardelli, E., Morazzoni, P. (1997). *Urtica dioica L.* *Fitoterapia*, 68, 387-402.
- Bond, M., Rogers, G., Peters, J., Anderson, R., Hoyle, M., Miners, A., Moxham, T., Davis, S., Thokala, P., Wailoo, A., Jeffreys, M., Hyde, C. (2012). The effectiveness and cost-effectiveness of donepezil, galantamine, rivastigmine and memantine for the treatment of Alzheimer's disease (review of technology appraisal no. 111): A systematic review and economic model. *Health Technology Assessment*, 16, 1-469.
- Bonura, A., Corinti, S., Schiavi, E., Giacomazza, D., Gianguzza, F., Di Felice, G., Colombo, P. (2013). The major allergen of the *Parietaria* pollen contains an LPS-binding region with immuno-modulatory activity. *Allergy*, 68, 297–303.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*, 186, 343-355.
- Bors, W., Michel, C., Stettmaier, K. (1997). Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactors*, 6, 399-402.
- Boublik, Y., Saint-Aguet, P., Lougarre, A., Arnaud, M., Villatte, F., Estrada-Mondaca, S., Fournier, D. (2002). Acetylcholinesterase engineering for detection of insecticide residues. *Protein Engineering Design and Selection*, 15, 43-50.
- Boufford, D.E. (1997). Urticaceae Jussieu. In *Flora of North America Editorial Committee (Eds.) Flora of North America North of Mexico, Vol. 3: Magnoliophyta: Magnoliidae and Hamamelidae*. New York and Oxford.
- Bousquet, J., Hewitt, B., Guérin, B., Dhivert, H., Michel, F.B. (1986). Allergy in the Mediterranean area. II: Cross-allergenicity among Urticaceae pollens (*Parietaria* and *Urtica*). *Clinical Allergy*, 1, 57-64.
- Bousquet, J., Hewitt, B., Guérin, B., Dhivert, H., Michel, F.B. (1986). Allergy in the Mediterranean area. II: Cross-allergenicity among Urticaceae pollens (*Parietaria* and *Urtica*). *Clinical Allergy*, 1, 57-64.
- Brantner, A., Grein, A. (1994). Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 44, 35–40.

- British Herbal Pharmacopoeia. 1983. British Herbal Pharmacopoeia. 3rd ed. Bournemouth (UK): British Herbal Medicine Association
- Broer, J., Behnke, B. (2002). Immunosuppressing effect of IDS 30, a stinging nettle leaf extract, on myeloid dendritic cells in vitro. *Journal of Rheumatology*, 29, 656-658.
- Broncano, F., Rebuelta, M., Vivas, J.M., Fdez, G. (1983). Étude de L'effet Sur le Centre Cardiovasculaire de Quelques Preparations de L'Urtica dioica. *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, 17, 222–229.
- Broncano, F.J., Rebuelta, M., Lazaro-Carrasco, M.J.Y., Vivas, J.M. (1987a). Estudio del efecto sobre musculatura lisa uterina de distintos preparados de las hojas de *Urtica dioica* L. *Anales de la Real Academia de Farmacia; Instituto de Espana*, 53, 69–76.
- Broncano, F.J., Rebuelta, M., Vivas, J.M., Diaz, M.P. (1987b). Estudio de diferentes preparados de *Urtica dioica* L. sobre SNC. *Anales de la Real Academia de Farmacia; Instituto de Espana*, 53, 284–291.
- Brooks, J. D., Ward, W. E., Lewis, J. E., Hilditch, J., Nickell, L., Wong, E., et al. (2004). Supplementation with flaxseed alters estrogen metabolism in postmenopausal women to a greater extent than does supplementation with an equal amount of soy. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 318–325.
- Brown, Z., Strieter, R.M., Neild, G.H., Thompson, R.C., Kunkel, S.L., Westwick, J. (1992). IL-1 receptor antagonist inhibits monocyte chemotactic peptide 1 generation by human mesangial cells. *Kidney International*, 42, 95–101.
- Bucar, F., Britzmann, B., Streit, B., Weigend, M. (2006). LC-PDA-MS profiles of phenolic compounds in extracts of aerial parts of *Urtica* species, *Planta medica*, 72, poster 152.
- Budzianowski, J. (1991). Caffeic acid esters from *Urtica dioica* and *U. urens*. *Planta medica*, 57, 507.
- Budzianowsky, J. (1990). Caffeoylmalic and two pyrrole acids from *Parietaria officinalis*. *Phytochemistry*, 29(10), 3299-3301.
- Budzianowsky, J., Skrzypczak, L., Walkowiak, D. (1985). Flavonoids of *Parietaria officinalis*. *Journal of Natural Products*, 48(2), 336-337.
- Burda S., Oleszek, W. (2001). Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2774-2779.
- Calvo, M.I., Cavero, R.Y. (2014). Medicinal plants used for cardiovascular diseases in Navarra and their validation from Official sources. *Journal of Ethnopharmacology*, 157, 268–273
- Campbell, K.J., Perkins N.D. (2006). Regulation of NF-kappaB function. *Biochemical Society Symposium*, 73, 165-180.
- Cantero, G., Campanella, C., Mateos, S., Cortes, F. (2006). Topoisomerase II inhibition and high yield of endoreduplication induced by the flavonoids luteolin and quercetin. *Mutagenesis*, 21, 321–325.
- Cárceles, A., Girón L.M., Martínez, A.M. (1987). Diuretic activity of plants used for the treatment of urinary ailments in Guatemala. *Journal of Ethnopharmacology*, 19, 233–245.
- Castro, A., Martinez, A. (2006). Targeting Beta-Amyloid Pathogenesis Through Acetylcholinesterase Inhibitors. *Current Pharmaceutical Design*, 12, 4377-4387.
- Catto, M., Pisani, L., Leonetti, F., Nicolotti, O., Pesce, P., Stefanachi, A., et al. (2013). Design, synthesis and biological evaluation of coumarin alkylamines as potent and selective dual binding site inhibitors of acetylcholinesterase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21, 146–152.
- Cavero, R.Y., Akerreta, S., Calvo, M.I. (2011). Pharmaceutical ethnobotany in Northern Navarra (Iberian Peninsula). *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 138–146.

- Celik, I., Tuluce Y. (2007). Elevation protective role of *Camellia sinensis* and *Urtica dioica* infusion against trichloroacetic acid-exposed rats. *Phytotherapy Research*, 11, 1039-1044.
- Čerovský, J., Feráková, V., Holub, J., Maglocký, Š., Procházka, F. (1999). Red Book of Endangered and Rare Species of Flora and Fauna of the Slovak Republic and the Czech Republic. 5. Higher plants. (Červená kniha ohrozených a vzácných druhov rastlín a živočíchov SR a ČR 5. Vyššie rastliny). Príroda, Bratislava.
- Cervantes-Laurean, D., Schramm, D.D., Jacobson, E.L., Halaweish, I., Bruckner, G.G., Boissonneault, G.A. (2006). Inhibition of advanced glycation end product formation on collagen by rutin and its metabolites. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17, 531–540.
- Cetinus, E., Kilinc, M., Inanc, F., Kurutas, E.B., Buzkan, N. (2005). The role of *Urtica dioica* (Urticaceae) in the prevention of oxidative stress caused by tourniquet application in rats. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 205, 215–221.
- Chaurasia, N., Wichtl, M. (1987a). Flavonolglykoside aus *Urtica dioica*. *Planta medica*, 432-434.
- Chaurasia, N., Wichtl, M. (1987b). Sterols and steryl glycosides from *Urtica dioica*. *Journal of Natural products*, 50(5), 881-885.
- Chen, F., Bhatia, D., Chang, Q., Castranova, V. (2006). Finding NEMO by K63-linked polyubiquitin chain. *Cell Death and Differentiation*, 13, 1835–1838.
- Chitnis, S., Rao, J. (2009). Rivastigmine in Parkinsons disease dementia. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 5, 941-955.
- Cho, A.S., Seon-Min, J., Myung-Joo, K., Jiyoung Y., Kwon-Il, S., Myung-Sook, C., Mi-Kyung, L. (2010). Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 937–943.
- Cho, J.Y., Park, J., Kim, P.S., Yoo, E.S., Baik, K.U. Park, M.H. (2001). Savinin, a lignan from *Pterocarpus santalinus* inhibits tumor necrosis factor-alpha production and T cell proliferation. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24, 167-171.
- Cho, M.K., Park, J.W., Jang, Y. P., Kim Y. C., Kim, S. G. (2002). Potent inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase expression by dibenzylbutyrolactone lignans through inhibition of I-kappaBalpha phosphorylation and of p65 nuclear translocation in macrophages. *International Immunopharmacology*, 2, 105-116.
- Cho, M.K., Jang, Y. P., Kimand, Y.C., Kim, S.G. (2004). Arctigenin, a phenylpropanoid dibenzylbutyrolactone lignan, inhibits MAP kinases and AP-1 activation via potent MKK inhibition: the role in TNF-alpha inhibition. *International Immunopharmacology*, 4, 1419-1429.
- Chrubasik, J., Roufogalis, B., Wagner, H., Chrubasik, S. (2007). A comprehensive review on the stinging nettle effect and efficacy profiles. Part II: *Urticae radix*. *Phytomedicine*, 14, 568-579.
- Chrubasik, S., Enderlein, W., Bauer, R., Grabner, W. (1997). Evidence for antirheumatic effectiveness of herba *Urticae dioicae* in acute arthritis: a pilot study. *Phytomedicine*, 4, 105–108.
- Clark-Lewis, I., Schumacher, C., Baggiolini, M., Moser, B. (1991). Structure-activity relationships of interleukine-8 determined using chemically synthesized analogs. Critical role of NH2-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 23128–23134.
- Clifford, M.N., Walker, R. (1987). Chlorogenic acids confounders of coffee-serum cholesterol relationships. *Food Chemistry*, 24, 77-80.

- Clifford, M. (2000). Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1033-1043.
- Clifford, M.N., Knight, S., Kuhnert, N. (2005). Discriminating between six isomers of dicaffeoylquinic acids by LC-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3821–3832.
- Collier, H.O.J., Chesher, G.B. (1956). Identification of 5-hydroxytryptamine in the sting of the nettle (*Urtica dioica*). *British Journal of Pharmacology*, 11, 186–189.
- Colombel, J.F., Rutgeerts, P., Reinisch, W., Esser, D., Wang, Y., Lang, Y., et al. (2011). Early mucosal healing with infliximab is associated with improved long-term clinical outcomes in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 141, 1194–1201.
- Colombo, P., Bonura, A., Costa, M., Izzo, V., Passantino, R., Locorotondo, G., et al. (2003). The allergens of *Parietaria*. *International Archives of Allergy and Immunology*, 130, 173–179.
- Colombo, P., Kennedy, D., Ramsdale, T., Costa, M.A., Duro, G., Izzo, V., et al. (1998). Identification of an immunodominant IgE epitope of the *Parietaria judaica* major allergen. *Journal of Immunology*, 160, 2780–2785.
- Čolovic, M., Krstic, D., Lazarevic-Pašti, T., Bondžic, A., Vasic, V. (2013). Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11, 315-335.
- Corbí, A.L., Cortes, C., Bousquet, J., Basomba, A., Cistero, A., Garcia-Selles, J., et al. (1985). Allergenic cross-reactivity among pollens of Urticaceae. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, 77(4), 377-383.
- Cornara, L.A., La Rocca, S., Marsili, M.G. (2009). Mariotti Traditional uses of plants in the Eastern Riviera (Liguria, Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, 125, 16–30.
- Cortes, L., Carvalho, A.L., Todo-Bom, A., Faro, C., Pires, E., Verissimo, P. (2006). Purification of a novel aminopeptidase from the pollen of *Parietaria judaica* that alters epithelial integrity and degrades neuropeptides. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118, 878-884.
- Costa, L.G. (2006). Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica Chimica Acta*, 366, 1-13.
- Costa, M.A., Colombo, P., Izzo, V., Kennedy, H., Venturella, S., Cocchiara, R., et al. (1994). cDNA cloning expression and primary structure of Par j I, a major allergen of *Parietaria judaica* pollen. *FEBS Letters*, 341, 182–186.
- Creagh, E.M., O'Neill, L.A. (2006). TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends in Immunology*, 27, 352-357.
- Cremer, H. (1934). Wissenschaftlicher Teil: Biologische Versuche mit Pflanzensäften. *Dtsch Apoth Zeit*, 80, 1277–1279.
- Cremin, P., Kasim-Karakas, S., Waterhouse, A.L. (2001). Lc/es-ms detection of hydroxycinnamates in human plasma and urine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1747–1750.
- Cuenda, A., Rousseau, S. (2007). p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1773, 1358–1375.
- Curtis-Prior, P. (2004). The Eicosanoids. Wiley, Cambridge, England
- Cushing, S.D., Berliner, J.A., Valente, A.J., Territo, M.C., Navab, M., et al. (1990). Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 5134–5138.

- Cuyckens, F., Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39, 1–15.
- Czarnetzki, B.M., Thiele, T., Rosenbach, T. (1990). Immunoreactive leukotrienes in nettle plants (*Urtica urens*). *International Archives of Allergy and Immunology*, 91, 43–46.
- Daher, C.F., Baroody, K.G., Baroody, G.M. (2006). Effect of *Urtica dioica* extract intake upon blood lipid profile in the rats. *Fitoterapia*, 77, 183–188.
- Daniel, M., Wichtl, M. (1997). A comparative examination of rhizomes from *Urtica kioviensis* and *Urtica dioica*. *Planta medica*, 57(supplement issue 2), poster A69.
- Danihelka, J., Lepší, M. (2004). Kopriva lužní, *Urtica kioviensis*, na soutoku Moravy a Dyje (*Urtica kioviensis* near the confluence of the Morava and Dyje rivers). *Zprávy České botanické společnosti*, 39(1), 25–35.
- Darboux, I., Barthalay, Y., Piovant, M., Hipeau-Jacquotte, R. (1996). The structure–function relationships in *Drosophila* neurotactin show that cholinesterasic domains may have adhesive properties. *EMBO Journal*, 15, 4835–4843.
- Delie, F., Rubas, W. (1997). A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: Advantages and limitations of the Caco-2 model. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 14, 221–286.
- Demetres, P.A., Lo, S.K., Olsen-Egbert, E., Walz, A., Baggiolini, M., Cohn, Z.A. (1990). Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *Journal of Experimental Medicine*, 171, 1155–1162.
- Desai, A.K., Grossberg, G.T. (2005). Rivastigmine for Alzheimer's disease. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 5, 563–580.
- Deschner, E.E., Ruperto, J., Wong, G., Newmark, H.L. (1991). Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis*, 12, 1193–1196.
- Deshmane, S., Kremlev, S., Amini, S., Sawaya, B.E. (2009). Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of interferon & cytokine research*, 29(6), 313–326.
- Detmers, P., Powell, D., Walz, A., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., Cohn, Z.A. (1991). Differential effects of neutrophil-activating peptide 1/IL-8 and its homologues on leukocyte adhesion and phagocytosis. *Journal of Immunology*, 147, 4211–4217.
- Deutsch, V.R., Pick, M., Perry, C., Grisar, D., Hemo, Y., Golan-Hadari, D., et al. (2002). The stress associated acetylcholinesterase variant AChE-R is expressed in human CD34(+) hematopoietic progenitors and its C-terminal peptide ARP promotes their proliferation. *Experimental Hematology*, 30, 1153–1161.
- Dewick, P.M. (2009). Medicinal natural products: A biosynthetic approach, John Wiley & Sons Ltd, Chippingham, UK.
- DeYulia, G.J., Cárcamo, J.M., Bórquez-Ojeda, O., Shelton, C.C., Golde, D.W. (2005). H₂O₂ generated extracellularly by receptor-ligand interactions facilitates cell signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 5044–5049.
- Dobreff, M. (1924). Ueber ein neues Sekretin in der Brennessel (*Urtica dioica* L.). *Münch Med Woch*, 77, 773–774.
- Downes, G.B., Granato, M. (2004). Acetylcholinesterase function is dispensable for sensory neurite growth but is critical for neuromuscular synapse stability. *Developmental Biology*, 270(1), 232–245.

- Dunzendorfer, U. (1984). Der Nachweis von Reaktionseffekten des Extractum Radicis Urticae (ERU) im menschlichen Prostatagewebe durch Fluoreszenzmikroskopie. *Zeitschrift fuer Phytotherapie*, 5, 800–804.
- Duro, C., Costa, M.A., Izzo, V., Porcasi, R., Difiore, R., Locorotondo, G., et al. (1997). Isolation and characterization of two cDNA clones, coding for isoforms of the *Parietaria judaica* major Par j 1.0101. *International Archives of Allergy and Immunology*, 112, 348-355.
- Duro, C., P., Costa, M.A., Izzo, V., Porcasi, R., Difiore, R., Locorotondo, G., et al. (1996). cDNA cloning, sequence analysis and allergological characterization of Par j 2.0101, a new major allergen of *Parietaria judaica* pollen. *FEBS Letters*, 399, 295-298.
- Ebisawa, M., Yamada, T., Bickel, C., Klunk, D., Schleimer, R.P. (1994). Eosinophil transendothelial migration induced by cytokines. III. Effect of the chemokine RANTES. *Journal of Immunology*, 153, 2153–2160.
- Eckmann, L., Stenson, W.F., Savidge, T.C., Lowe, D.C., Barrett, K.E., Fierer, J., et al. (1997). Role of intestinal epithelial cells in the host secretory response to infection by invasive bacteria. Bacterial entry induces epithelial prostaglandin h synthase-2 expression and prostaglandin E2 and F2alpha production. *Journal of Clinical Investigation*, 100, 296–309.
- Edmondson J.R. (1996). Urticaceae, u Tutin T.G., Burges N.A., Chater A.O., Edmondson J.R., Heywood V.H., Moore D.M., Valentine D.H., Waters S.M., Webb D.A., uredn., Flora Europaea 2nd. ed., I: 79. Cambridge University Press, Cambridge.
- Egerton, M., Fitzpatrick, D.R., Catling, A.D., Kelso, A. (1996). Differential activation of T cell cytokine production by the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. *European Journal of Immunology*, 26, 2279–2285.
- El Haouari, M., Bnouham, M., Bendahou, M., Aziz, M., Ziyat, A., Legssyer, A., et al. Inhibition of rat platelet aggregation by *Urtica dioica* leaves extracts. *Phytotherapy Research*, 20, 568–572.
- Ellman, G., Courtney, D., Andres, V., Featherstone, R. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
- Emmelin, N., Feldberg, W. (1947). The mechanism of the sting of the common nettle (*Urtica urens*). *Journal of Physiology*, 106, 440–455.
- Enderle-Schmitt, U., Gutschank, W.M., Aumuller, G. (1988). Wachstumskinetik von Zellkulturen aus BPH unter Einfluss von Extractum radicis urticae (ERU). In: Bauer, H.W. (Ed.), Benigne Prostatahyperplasie II. Klinische und Experimentelle Urologie. *W Zuckschwerdt Verlag, New York*, 19, 56–61.
- Ermakova, S.S. (ed.). 2005. Red Book of the Republic of Belarus. Plants. "Belorussian Encyclopedia" Petrus Brovka, Minsk.
- Esposito, V., Lucariello, A., Savarese, L., Cinelli, M.P., Ferraraccio, F., Bianco, A., et al. (2012). Morphology changes in human lung epithelial cells after exposure to diesel exhaust micron sub particles (PM1.0) and pollen allergens. *Environmental Pollution*, 171, 162-167.
- European Pharmacopeia 6th edition (2007). European Directorate for the Quality of Medicines - Council of Europe (COE), Strasbourg Cedex, France.
- Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., Walker, R. B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8139–8144.

- Exarchou, V., Fiamegos, Y., van Beek, T., Nanos, C., Vervoort, J. (2006). Hyphenated chromatographic techniques for the rapid screening and identification of antioxidants in methanolic extracts of pharmaceutically used plants. *Journal of Chromatography A*, 1112, 293-302.
- Fang, A., Guodong, Y., Jiaming, T., Wang, S. (2012). Antioxidant effects of the orientin and vitexin in *Trollius chinensis* Bunge in D-galactose-aged mice. *Neural Regeneration Research*. 7(33), 2565–2575.
- Farag, M., Weigend, M., Luebert, F., Brokamp, G., Wessjohann, L. (2013). Phytochemical, phylogenetic, and anti-inflammatory evaluation of 43 *Urtica* accessions (stinging nettle) based on UPLC–Q-TOF-MS metabolomic profiles. *Phytochemistry*, 96, 170–183.
- Farlow, M., Veloso, F., Moline, M., Yardley, J., Brand-Schieber, E., Bibbiani, F., et al. (2011). Safety and tolerability of donepezil 23 mg in moderate to severe Alzheimer's disease. *BMC Neurology*, 11, 57-65.
- Faro, C., Costa-Pinto, M., Antonio, C., Cortes, L., Verissimo, P., Todo-Bom, A., Pires, E. (1998). A Serine Proteinase from *Parietaria Judaica* Pollen: Partial Purification, Characterization and Clinical Implications. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*, (6)2, 99-100.
- Farzami, B., Ahmadvand, D., Vardasbi, S., Majin, F.J., Khaghani, Sh. (2003). Induction of insulin secretion by a component of *Urtica dioica* leave extract in perfused Islets of Langerhans and its *in vivo* effects in normal and streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 47–53.
- Felton, G.W., Donata, K., Del Vecchio, R.J., Duffey, S.S. (1989). Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, 15, 2667-2694.
- Ferrary, E., Cohen-Tannoudji, M., Pehau-Arnaudet, G., Lapillonne, A., Athman, R., Ruiy, T., et al. (1999). *In Vivo*, Villin Is Required for Ca²⁺-dependent F-actin Disruption in Intestinal Brush Border. *The Journal of Cell Biology*, 146(4), 819–829.
- Fischer, M., Wilbert, D. (1992). Wirkprufungeines Phytopharmakons zur Behandlung der benignen Prostatahyperplasie (BPH). In: Rutishauser, G. (Ed.), *Benigne Prostatahyperplasie III*. In: Klinische und Experimentelle Urologie. *W Zuckschwerdt Verlag, New York*, 22, 79–84
- Foley, S., Navaratnam, S., McGarvey, D.J., Land, E.J., Truscott, T.G., Rice-Evans, C.A. (1999). Singlet oxygen quenching and the redox properties of hydroxycinnamic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1202–1208.
- Frank, B., Bohn, I., Uehleke, B. (1998). *Urtica*. Volume 3. In: Blaschek W, Hänsel R, Keller K, Reichling J, Rmippler H, Schneider (Hrsg.) G, editors. *Hagers Handbuch*. Berlin: Springer.
- Frick, J., Aulitzky, W. (1987). Auswertung von Hormonund Samenmessgrossen bei Patienten mit Stauungszustanden der Prostata, die mit Extract. *Radicis urticae* (ERU) behandelt wurden. In: Bauer, H.W. (Ed.), *Benigne Prostatahyperplasie*. Klinische und Experimentelle Urologie, *W Zuckschwerdt Verlag, San Francisco*, 14, 48–51.
- Friis, I. (1989). The Urticaceae: a systematic review. In P. R. Crane and S. Blackmore [eds.], *Evolution, systematics, and fossil history of the Hamamelidae*, vol. 2, Systematics Association Special Volume 40B, 285–308. Oxford Science Publications, Oxford, UK
- Fukata, M., Michelsen, K.S., Eri, R., Thomas, L.S., Hu, B., Lukasek, K., et al. (2005). Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *American Journal of Physiology*, 288, 1055–1065.
- Fukuto, J.M., Ignarro, L.J. (1997). *In vivo* aspects of nitric oxide (NO) chemistry: does peroxynitrite (OONO) play a major role in cytotoxicity? *Accounts of Chemical Research*, 30, 149-152.

- Gansser, D., Spiteller, G. (1995a). Aromatase inhibitors from *Urtica dioica* roots; *Planta Medica*, 61, 138-140.
- Gansser, D., Spiteller, G. (1995b). Plant constituents interfering with human sex hormone-binding globulin. Evaluation of a test and its application to *Urtica dioica* root extracts. *Zeitschrift für Naturforschung. Section C: Journal of Biosciences*, 50c, 98–104.
- Gao, X., Zheng, C.Y., Yang, L., Tang, X.C., Zhang, H.Y. (2009). Huperzine A protects isolated rat brain mitochondria against betaamyloid peptide. *Free Radical Biology and Medicine*, 46, 1454-1462.
- Geiser, T., Dewald, B., Ehrenguber, M.U., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M. (1993). The interleukine-8-related chemotactic cytokines GRO alpha, GRO beta, and GRO gamma activate human neutrophil and basophil leukocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 15419–15424.
- Gertsch, J., Tobler, R. T., Brun, R., Sticher O., Heilmann, J. (2003). Antifungal, antiprotozoal, cytotoxic and piscicidal properties of Justicidin B and a new arylnaphthalide lignan from *Phyllanthus piscatorum*. *Planta Medica*, 69, 420-424.
- Giacobini, E. (2004). Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacological Research*, 50, 433-440.
- Gilbert, M.M., Auld, V.J. (2005). Evolution of clams (cholinesterase-like adhesion molecules): structure and function during development. *Frontiers in Bioscience*, 10, 2177-2192.
- Gilmore, T.D. (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25, 6680–6684.
- Giridharan, P., Somasundaram, S. T., Perumal, K., Vishwakarma, R. A., Karthikeyan, N. P., Velmurugan R. Balakrishnan, A. (2002). Novel substituted methylenedioxy lignan suppresses proliferation of cancer cells by inhibiting telomerase and activation of c-myc and caspases leading to apoptosis. *British Journal of Cancer*, 87, 98-105.
- Gjorgieva, D., Kadifkova-Panovska, T., Baèeva, K., Stafilov, T. (2011). Assessment of heavy metal pollution in Republic of Macedonia using a plant assay. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 60, 233-240.
- Gould, K.S., Lister, C. (2006). Flavonoid functions in plants, u: Andersen, Ø.M., Markham, K.R. (ed.), *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications*, Taylor & Francis, Boca Raton, USA.
- Goun, E.A., Petrichenko, V.M., Solodnikov, S.U., Suhinna, T.V., Kline, M.A., Cunningham, G., et al. (2002). Anticancer and antithrombin activity of Russian plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 81, 337–342.
- Green, L., Wagner, D., Glogowski, J., Skipper, P., Wishnok, J., Tannenbaum, S. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 126, 131–138.
- Green T. (1824). *Universal herbal*. 2nd ed London: Caxton Press.
- Grevsen, K., Frette, X.C., Kristensen, L.P. (2008). Concentration and Composition of Flavonol Glycosides and Phenolic Acids in Aerial Parts of Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.) are Affected by Nitrogen Fertilization and by Harvest Time. *European Journal of Horticultural Sciences*, 73(1), 20-27.
- Grieve, M. (1931). *A modern herbal*. 3rd ed. London: Tiger Books Int. Reprint Edition 1994.
- Griffiths, L.A., Barrow, A. (1972). Metabolism of flavonoid compounds in germ-free rats. *Biochemical Journal*, 130, 1161–1162.
- Groves, J. (1999). Peroxynitrite: reactive, invasive and enigmatic, *Current opinion in chemical biology*, 3, 226-235.

- Guil-Guerrero, J.L., Reboloso-Fuentes, M.M., Torija Isasa, M.E. (2003). Fatty acids and carotenoids from stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 111–119.
- Gul, N., Ahmed, S.A., Smith, L.A. (2004). Inhibition of the protease activity of the light chain in of type A botulinum neurotoxin by aqueous extract from stinging nettle (*Urtica dioica*) leaf. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 95, 215–219.
- Gülcin, I., Küfrevioğlu, Ö.I., Oktay, M., Büyükköroğlu, M.E. (2004). Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, 90, 205–215.
- Gulpinar, A.R., Orhan, I.E., Kan, A., Senol, F.S., Celik, S.A., Kartal, M. (2012). Estimation of *in vitro* neuroprotective properties and quantification of rutin and fatty acids in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) cultivated in Turkey. *Food Research International*, 46, 536–543.
- Günes, H.V., Degirmenci, I., Aydin, M., Bozan, B., Aral, E., Tunalier, Z., et al. (1999). The effects of *Rumex patientia* L. and *Urtica dioica* L. on some blood and urine parameters, and liver and kidney histology in diabetic rats. *Tr Journal of Medicinal Sciences*, 29, 227–232.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. (2007). *Free radicals in biology and medicine*, 4th edition, Oxford University Press, New York.
- Hammel, P., Larrey, D., Bernuau, J., Kalafat, M., Freneaux, E., Babany, G., et al. (1990). Acute hepatitis after tetrahydroaminoacridine administration for Alzheimer's-Disease. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 12(3), 329-331.
- Han, Y. (2009). Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. *International Immunopharmacology*, 9, 207–211.
- Hanneman, E., Wester-field, M. (1989). Early expression of acetylcholinesterase activity in functionally distinct neurons of the Zebra-fish. *Journal of Comparative Neurology*, 284, 350-361.
- Hansen, F. (1996). *Echinacea* unter verdacht. *Die Zeit*, supplement 20.
- Harborne, J.B., Williams, C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481–504.
- Harput, U.S., Saracoglu, I., Ogihara, Y. (2005). Stimulation of lymphocyte proliferation and inhibition of nitric oxide production by aqueous *Urtica dioica* extract. *Phytotherapy Research*, 19, 346–348.
- Harrison, R.K. (1966). *Healing herbs of the Bible*. EJ Brill, Leiden.
- Hartmann, R.W., Mark, M., Soldati, F. (1996). Inhibition of 5 a-reductase and aromatase by PHL-00801 (Prostatonins), a combination of PY 102 (*Pygeum africanum*) and UR 102 (*Urtica dioica*) extracts. *Phytomedicine*, 3, 121–128.
- Hausott, B., Greger H., Marian, B. (2003). Naturally occurring lignans efficiently induce apoptosis in colorectal tumor cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 129, 569-576.
- Hayden, M.S., West, A.P., Ghosh, S. (2006). NF- κ B and the immune response. *Oncogene*, 25, 6758–6780.
- Haznagy, A. (1943). Beiträge zur blutzuckerspiegell beeinflussenden Wirkung der *Urtica dioica* und *Urtica urens*. *Chemisches Zentralblatt*, 114, 247–255.
- Herkert, N.M., Thiermann, H., Worek, F. (2011). *In vitro* kinetic interactions of pyridostigmine, physostigmine and soman with erythrocyte and muscle acetylcholinesterase from different species. *Toxicology Letters*, 206, 41-46.

- Hertog, M.G.L., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., et al. (1995). Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of Internal Medicine*, 155, 381–386.
- Hirano, T., Homma, M., Oka, K. (1994). Effects of stinging nettle root extracts and their steroidal components on the Na⁺ K⁺-ATPase of the benign prostatic hyperplasia. *Planta Medica*, 60, 30–33.
- Hoch, R., Schraufstatter, I., Cochrane, C. (1996). *In vivo*, *in vitro*, and molecular aspects of interleukin-8 and the interleukin-8 receptors. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 128, 134-145.
- Hollman, P.C.H., Arts, I.C.W. (2000). Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1081–1093.
- Hollman, P.C.H., de Vries, J.H.M., van Leeuwen, S.D., Mengelers, M.J.B., Katan, M.B. (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition*, 62, 1276–1282.
- Holmes, W., Lee, J., Kuang, W.J., Rice, G.C., Wood, W.I. (1991). Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science*, 253, 1278-1280.
- Hort, Sir A. F. (1916). Enquiry into Plants and Minor Works on Odours and Weather Signs, Translation of Theophrastus (c.300 BC). Book VII. Heinemann, London.
- Hryb, D.J., Khan, M.S., Romas, N.A., Rosner, W. (1995). The effect of extracts of the roots of the stinging nettle (*Urtica dioica*) on the interaction of SHBG with its receptor on human prostatic membranes. *Planta Medica*, 61, 31–32.
- <http://pioneerthinking.com/beauty/files/2014/05/Nettle.jpg> (08.03.2015.) slika 2.24.
- <http://wildearthfineart.com/wp-content/uploads/2012/07/W5E5782-567x400.jpg> (08.03.2015) slika 2.24.
- <http://www.albufera.com/parque/content/parietaria-lusitanica-l> (01.03.2015.) slika 2.1. *Parietaria lusitanica*
- Hubbe, M. (2002). Rheumatische Erkrankungen – eine beherrschbare Herausforderung. *Der Kassenarzt*, 16, 32–38.
- Huber, P.R., Rutishauser, C., Romics, I. (1992). Urinsteroide bei Patienten unter Behandlung mit Extractum Radicis Urticae. In: Rutishauser, G. (Ed.), Benigne Prostatahyperplasie III. In: Klinische und Experimentelle Urologie. *W Zuckschwerdt Verlag, New York*, 22, 68–73.
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K. (1996). "VMD - Visual Molecular Dynamics", *Journal of Molecular Graphics*, 14, 33-38.
- Hutchins, A.M., Martini, M.C., Olson, B.A., Thomas, W., Slavin, J.L. (2001). Flaxseed consumption influences endogenous hormone concentrations in postmenopausal women. *Nutrition and Cancer*, 39, 58–65.
- Hyde, C., Peters, J., Bond, M., Rogers, G., Hoyle, M., Anderson, R., et al. (2013). Evolution of the evidence on the effectiveness and cost-effectiveness of acetylcholinesterase inhibitors and memantine for Alzheimer's disease: systematic review and economic model. *Age Ageing*, 42, 14-20.
- Iizuka, M., Konno, S. (2011). Wound healing of intestinal epithelial cells. *World Journal of Gastroenterology*, 17(17), 2161-2171.
- Inglis, F. (2002). The tolerability and safety of cholinesterase inhibitors in the treatment of dementia. *International Journal of Clinical Practice*, 127, 45-63.

- Ip, Y.T., Davis, R.J. (1998). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) – from inflammation to development. *Current Opinion in Cell Biology*, 10, 205–219.
- Ito, T., Toshitsugo, I., Atsushi, Y., Takeshi, Y., Koji, T., Hiroshi, Y., et al. (1995). Effect of altered coffee intake on lipid metabolism, in Seizieme Colloque Scientifique International sur le Cafea. ASIC, Paris.
- Jacobson, E.A., Newmark, H., Baptista, J., Bruce, W.R. (1983). A preliminary investigation of the metabolism of dietary phenolics in humans. *Nutrition reports international*, 28, 1409-1417.
- Jarry, H., Seiwerts, H., Seiwerts, S., Popp, M., Wuttke, W., Christoffel, V. (1999). *Urtica dioica* extract BNO 1250 inhibits aromatase activity in human JEG-3 cells. In: Proceedings of the Joint Meeting of the ASP, AFERP, GA and PSE on 2000 Years of Natural Products Research – Past, Present and Future, 26–30 July 1999, Amsterdam. University Gottingen, Neumarkt, Abstract no. 738.
- Ji, H.F., Zhang, H.Y. (2006). Theoretical evaluation of flavonoids as multipotent agents to combat Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 767, 3-9.
- Jiang, P., Burczynski, F., Campbell, C., Pierce, G., Austria, J.A., Briggs, C.J. (2007). Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum*, and *F. homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation. *Food Research International*, 40, 356–364.
- Jiang, Z., Mak, T.W., Sen, G., Li, X. (2004). Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domaincontaining adaptor inducing IFN-beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 3533–3538.
- Jiarui, C., Lin, Q., Friis, I., Wilmot-Dear, M., Monro, A. (2003). Urticaceae Jussieu. In Wu, Z.Y., P.H. Raven & D.Y. Hong, eds. 2003. Flora of China. Vol. 5 (Ulmaceae through Basellaceae). Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
- Johnson, G.L., Nakamura, K. (2007). The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1773, 1341–1348.
- Jung, K. Y., Kim, D. S., Oh, S. R., Park, S. H., Lee, I. S., Lee, J. J., et al. (1998). Magnone A and B, novel anti-PAF tetrahydrofuran lignans from the flower buds of *Magnolia fargesii*. *Journal of Natural Products*, 61, 808-811.
- Kabata-Pendias, A. (2011). Trace elements in soils and plants, 4th ed. CRC Press, Taylor and Francis Group, LLC, Boca Raton.
- Kanter, M., Dede, S., Cemek, M., Ozbek, H., Uygan, I., et al. (2003). Effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and some liver enzymes in CCl₄-treated rats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 50, 264–268.
- Kapadia, G.J., Azuine, M.A., Tokuda, H., Hang, E., Mukainaka, T., Nishino, H., et al. (2002). Inhibitory effect of herbal remedies on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-promoted Epstein-Barr virus early antigen activation. *Pharmacological Research*, 45, 213–220.
- Karin, M., Greten, F.R. (2005). NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature Reviews Immunology*, 5, 749–759.
- Karin, M., Lin, A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nature Immunology*, 3, 221–227.
- Katalinic, V., Milos M, Kulisic T, Jukic M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94, 550–557.
- Katan, M.B., Urgert, R. (1995). The cholesterol-elevating factor from coffee beans, in Seizieme Colloque Scientifique International sur le Cafe. ASIC, Paris.

- Kauss, T., Moynet, D., Rambert, J., Al-Kharrat, A., Brajot, S., Thiolat, D., et al. (2008). Rutoside decreases human macrophage-derived inflammatory mediators and improves clinical signs in adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Research and Therapy*, *10*(1), R19.
- Kavalali, G.M. (2003). *Urtica*: therapeutic and nutritional aspects of stinging nettles. Volume 37, Taylor & Francis, New York.
- Kavtaradze, N., Alaniya, M. (2003). Anthocyan glucosides from *Urtica dioica*. *Chemistry of natural compounds*, *39*(3), 315.
- Kavtaradze, N., Alaniya, M., Aneli, J. (2001). Chemical components of *Urtica dioica* growing in Georgia. *Chemistry of natural compounds*, *37*(3), 287.
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*, *11*, 115–122.
- Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inoue, J., Mühlradt, P.F., Sato, S., et al. (2001). Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *Journal of Immunology*, *167*, 5887–5894.
- Kawai, T., Akira, S. (2007). Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors, *TRENDS in Molecular Medicine*, *13*(11), 460-469.
- Kayashita, J., Shimaoka, I., Nakajoh, M., Yamazaki, M., Kato, N. (1997). Consumption of buckwheat protein lowers plasma cholesterol and raises fecal neutral sterols in cholesterol-fed rats because of its low digestibility. *Journal of Nutrition*, *127*, 1395–1400.
- Keeser, E. (1940). Zur Wirkungsweise der Brennessel (*Urtica dioica*) insbesondere auf den Harnsäurestoffweshsel. *DMW*, *66*, 849–851.
- Keles, O., Bakirel, T., Ak, S., Alpmar, A. (2001). The antibacterial activity of some plants used for medicinal purposes against pathogens of veterinary importance. *Folla Veterunaria*, (1), 22–25.
- Kenneth, S., Morawetz, J., Pires, C., Nepokroeff, M., Conti, E., Zjhra, M. (2002). Urticalean rosids: Circumscription, rosid ancestry, and phylogenetics based on rbcL, trnL-F, and ndhF sequences. *American Journal of Botany*, *89*(9), 1531-1546.
- Khan, M.M., Ahmad, A., Ishrat, T., Khuwaja, G., Srivastawa, P., Khan, M.B., (2009). Rutin protects the neural damage induced by transient focal ischemia in rats. *Brain Research*, *1292*, 123–135.
- Khoury, S., Cockett, A., Aso, Y., Chatelain, C., Andersson, L., Abrams, P., et al. (2000). International consultation on urological diseases: a decade of progress. *Prostate*, *45*, 194–199.
- Kim, J.H., Lee, B.C., Kim, J.H., Sim, G.S., Lee, D.H., Lee, K.E., et al. (2005). The isolation and antioxidative effects of vitexin from *Acer palmatum*. *Archives of Pharmacal Research*, *28*(2), 195-202.
- Király, G. (ed.). (2007). Red List of the vascular flora of Hungary (Vörös Lista: A magyarországi edényes flóra veszélyeztetett fajai). pp. 73. Sajat kiadás, Sopron.
- Kirchhoff, H.W. (1983). Brennesselsaft als Diuretikum. *Zeitschrift fuer Phytotherapie*, *4*, 621–626.
- Kitisripanya, N., Sarpapakorn, P., Wolschann, P., Hannongbua, S. (2011). Binding of huperzine A and galanthamine to acetylcholinesterase, based on ONIOM method. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *7*, 60– 68.
- Klingelhofer, S., Obertreis, B., Quast, S., Behnke, B. (1999). Antirheumatic effect of IDS 23, a stinging nettle leaf extract, on in vitro expression of T helper cytokines. *Journal of Rheumatology*, *26*, 2517–2522.

- Koch, E. (1995). Pharmakologie und Wirkmechanismen von Extrakten aus Sabalfruchten (*Sabal fructus*), Brennesselwurzeln (*Urticae radix*) und Kurbissamen (*Cucurbitae peponis semen*) bei der Behandlung der benignen Prostatahyperplasie. In: Loew, D., Rietbrock, N. (Eds.), *Phytopharmaka in Forschung und klinischer Anwendung*. Dietrich Steinkopff, Darmstadt.
- Koch, E., Biber, A. (1994). Pharmakologische Wirkungen von Sabal- und Urtikaextrakten als Grundlage für eine rationale medikamentöse Therapie der benignen Prostatahyperplasie. *Urologe B*, 34, 90–95.
- Koch, E., Jaggy, H.E.W., Chatterjee, S.S. (1995). Inhibition of human leukocyte elastase by an ethanolic extract from roots of the stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *Archives of Pharmacology*, 351 (Suppl.), R57 Abstract 225.
- Konrad, A., Mähler, M., Ari, S., Flogerzi, B., Klingelhöfer, S., Seibold, F. (2005). Ameliorative effect of IDS 30, a stinging nettle leaf extract, on chronic colitis. *International Journal of Colorectal Disease*, 20, 9–17.
- Konrad, L., Müller, H.H., Lenz, C., Laubinger, H., Aumüller, G., Lichius, J.J. (2000). Antiproliferative effect on human prostate cancer cells by a stinging nettle root (*Urtica dioica*) extract. *Planta Medica*, 66, 44–47.
- Kraus, R., Spiteller, G. (1990a). Phenolic compounds from roots of *Urtica dioica*. *Phytochemistry*, 29(5), 1653–1659.
- Kraus, R., Spiteller, G. (1990b). Terpene diols and terpene diol glucosides from roots of *Urtica dioica*. *Phytochemistry*, 30(4), 1203–1206.
- Kraus, R., Spiteller, G., Bartsch, W. (1991). (10E,12Z)-9-hydroxy-10,12-octadecadienoic acid, an aromatase inhibitor from the roots of *Urtica dioica*. *Liebigs Annalen der Chemie*, 4, 335–339.
- Kubitzki, K. (1993). Genera of Vascular Plants, volume II - Flowering plants, Dicotyledons (Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid families), eds. Kubitzki K, Rohwer J.G, Bittrich V. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany.
- Kudritsata, E., Filman, M., Zagorodskaya, M., Chikovanii, M. (1986). Carotenoids of *Urtica dioica*. *Chemistry of natural compounds*, 22(5), 604–605.
- Kuhnau, J. (1976). The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 24, 117–191.
- Kumar, K., Pandey, A. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, Article ID 162750, 16 pages.
- Lafay, S., Gueux, E., Rayssiguier, Y., Mazur, A., Remesy, C., Scalbert, A. (2005). Caffeic acid inhibits oxidative stress and reduces hypercholesterolemia induced by iron overload in rats. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 75, 119–125.
- Lafay, S., Morand, C., Manach, C., Besson, C., Scalber, A. (2006). Absorption and metabolism of caffeic acid and chlorogenic acid in the small intestine of rats. *British Journal of Nutrition*, 96, 39–46.
- Landete, J.M. (2012). Plant and mammalian lignans: A review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health. *Food Research International*, 46, 410–424
- Lane, R.M., Potkin, S.G., Enz, A. (2006). Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 9(1), 101–124.
- Laranjinha, J., Cadenas, E. (1999). Redox cycles of caffeic acid, α -tocopherol, and ascorbate: implications for protection of lowdensity lipoproteins against oxidation. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 48, 57–65.

- Lasheras, B., Turillas P, Cenarruzabeitia E. (1986). Étude pharmacologique préliminaire de *Prunus spinosa* L. Amelanchier ovalis Medikus, *Juniperus communis* L. et *Urtica dioica* L. *Plantes Médicinales Phytothérapie*, 20, 219–226.
- Laurence, M. (2005). Location, movement and survival: the role of chemokines in haemopoiesis and malignancy. *British Journal of Haematology*, 132, 255–267.
- Lavelle, E.C., Murphy C., O'Neill, L.A.J., Creagh, E.M. (2010). The role of TLRs, NLRs, and RLRs in mucosal innate immunity and homeostasis. *Mucosal Immunology*, 3(1), 17-28.
- Lee, K.H., Xiao, Z. (2005). Podophyllotoxins and analogs, in: *Anticancer agents from natural products*, Cragg G.M., Kingston, D.G.I., Newman, D.J. (ed.), CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA.
- Lee, W., Ku, S.K., Bae, J.S. (2012). Barrier protective effects of rutin in LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 3048–3055.
- Legssyer, A., Ziyat A, Mekhfi H, Bnouham M, Tahri A, Serhrouchni M, et al. (2002). Cardiovascular effects of *Urtica dioica* L. in isolated rat heart and aorta. *Phytotherapy Research*, 16, 503–507.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86, 973–983.
- Lesjak, M., Beara, I., Orčić, D., Ristić, J., Anačkov, G., Božin, B., Mimica-Dukić, N. (2013). Chemical characterisation and biological effects of *Juniperus foetidissima* Willd. 1806. *LWT - Food Science and Technology*, 53, 530–539.
- Lewis, T.S., Shapiro, P.S., Ahn, N.G. (1998). Signal transduction through MAP kinase cascades. *Advances in Cancer Research*. 74, 49–139.
- Li, G., Lee, C.S., Woo, M.H., Lee, S.H., Chang H.W., Son, J.K. (2004). Lignans from the bark of *Machilus thunbergii* and their DNA topoisomerases I and II inhibition and cytotoxicity. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27, 1147-1150.
- Loizzo, M.R., Tundis, R., Menichini, F., Menichini, F. (2008). Natural Products and their Derivatives as Cholinesterase Inhibitors in the Treatment of Neurodegenerative Disorders: An Update. *Current Medicinal Chemistry*, 15, 1209-1228.
- Longo, V., Costa, M.A., Fabio, F., Cuttitta, G., La Grutta, S., Colombo, P. (2015). Multiple IgE recognition on the major allergen of the *Parietaria pollen* Par j 2. *Molecular Immunology*. 63(2), 412-419.
- Longo, W.E., Panesar, N., Mazuski, J., Kaminski, D.L. (1998). Contribution of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 to prostanoid formation by human enterocytes stimulated by calcium ionophore and inflammatory agents. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 56, 325–339.
- López-Posadas, R., Ballester, I., Mascaraque, C., Suárez, M.D., Zarzuelo, A., Martínez-Augustin, O., Sánchez de Medina, F. (2010). Flavonoids exert distinct modulatory actions on cyclooxygenase 2 and NF-κB in an intestinal epithelial cell line (IEC18). *British Journal of Pharmacology*, 160, 1714–1726.
- Luan, J., Shattuck-Brandt, R., Haghnegahdar, H., Owen, J.D., Strieter, R., Burdick, M., et al. (1997). Mechanism and biological significance of constitutive expression of MGSA/GRO chemokines in malignant melanoma tumor progression. *Journal of Leukocyte Biology*, 62, 588–597.
- Luczaj, W., Skrzydlewska, E. (2005). Antioxidative properties of black tea. *Preventive Medicine*, 40(6), 910–918.

- Ludwig, G. (1945). Zur Pharmakologie der Brennessel [Eröffnungsdissertation]. Berlin (Dtsch): Friedrich Wilhelm Universität Berlin.
- Luscinskas, F.W., Kiely, J.M., Ding, H., Obin, M.S., Hébert, C.A., Baker, J.B., Gimbrone, M.A, Jr. (1992). *In vitro* inhibitory effect of IL-8 and other chemoattractants on neutrophil-endothelial adhesive interactions. *Journal of Immunology*, 149, 2163-2171.
- Macé, K., Offord, E.A., Harris, C.C., Pfeifer, A.M.A. (1998). Development of *in vitro* models for cellular and molecular studies in toxicology and chemoprevention. *Archives of Toxicology Supplement*, 20, 227-236.
- MacNaughton, W.K., Cushing, K. (2000). Role of constitutive cyclooxygenase-2 in prostaglandin-dependent secretion in mouse colon *in vitro*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 293, 539–544.
- Mahmoudi, M., Ebrahimadeh, M.A., Pourmorad, F., Yasini, S. (2007). Antinociception and locomotor impairment induction by methanolic extract of *Urtica dioica*. *International Journal of Biology and Biotechnology*, 4, 181–185.
- Manach, C., Morand, C., Demigne, C., Texier, O., Regeat, F., Remesy, C. (1997). Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Letters*, 409, 12–16.
- Manach, C., Morand, C., Texier, O., Favier, M.L., Agullo, G., Demigné. C., et al. (1995). Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *Journal of Nutrition*, 125, 1911–1922.
- Marks, F., Fürstenberg, G. (1999). Prostaglandins, Leukotrienes and other Eicosanoids: from biogenesis to clinical application. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Mavi, A., Terzi, Z., Özgen, U., Yildiri A, Coskun M. (2004). Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum* subsp. *verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27, 702–705.
- McQuaid, K.E., Keenan, A.K. (1997). Endothelial dysfunction and oxidative stress: roles for nitric oxide? *Experimental Physiology*, 82, 369-372.
- Mekhfi, H., Haouari, M.E., Legssyer. A., Bnouham. M., Aziz, M., Atmani, F., et al. (2004). Platelet anti-aggregant property of some Moroccan medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 94, 317–322.
- Meylan, E., Burns, K., Hofmann, K., Blancheteau, V., Martinon, F., Kelliher, M., Tschopp, J. (2004). RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappaB activation. *Nature Immunology*, 5, 503–507.
- Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Study*, 15(4), 523-530.
- Milde, J., Elstner, E.F., Grassmann, J. (2004). Synergistic inhibition of low-density lipoprotein oxidation by rutin, gamma-terpinene, and ascorbic acid. *Phytomedicine*, 11, 105–113.
- Mills, S.Y. (1988). The Dictionary of Modern Herbalism. Healing Art Press, Rochester Vermont.
- Mithofer, A., Schulze, B., Boland, W. (2004). Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Letters*, 566, 1-5.
- Moldovan, G.L., Pfander, B., Jentsch, S. (2007). PCNA, the Maestro of the Replication Fork. *Cell*, 129, 665-679.

- Moncada, M.C., Moura, S., Melo, M.J., Roque, A., Lodeiro, C., Pina, F. (2003). Complexation of aluminum (III) by anthocyanins and synthetic flavylum salts, A source for blue and purple color. *Inorganica Chimica Acta*, 356, 51-61.
- Moore, B.B., Arenberg, D.A., Stoy, K., Morgan, T., Addison, C.L., Morris, S.B., et al. (1999). Distinct CXC chemokines mediate tumorigenicity of prostate cancer cells. *American Journal of Pathology*, 154, 1503–1512.
- Morgenstern, E., Ziska, T. (1999). Aromatase- und odemhemmende Wirkung von Brennesselwurzel-Trockenextrakt LI 166. 10. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Phytotherapie, Munster, 11–13.
- Mousavi, Y., Adlercreutz, H. (1992). Enterolactone and estradiol inhibit each other's proliferative effect on MCF-7 breast cancer cells in culture. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 41, 615-619.
- Murakami, K., Tomasz, A. (1989). Involvement of multiple genetic determinants in high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 171, 874-879.
- Muth, D., Marsden-Edwards, E., Kachlicki, P., Stobiecki, M. (2008). Differentiation of isomeric malonylated flavonoid glyconjugates in plant extracts with UPLC-ESI/MS/MS. *Phytochemical Analysis*, 19, 444–452.
- Nagasawa, T., Tabata, N., Ito, Y., Nishizawa, N. (2002). Suppression of early and advanced glycation by dietary water-soluble rutin derivative in diabetic rats. *International Congress Series*, 1245, 403–405.
- Nahata, A., Dixit, V.K. (2012). Ameliorative effects of stinging nettle (*Urtica dioica*) on testosterone-induced prostatic hyperplasia in rats, *Andrologia*, 44, 396–409.
- Narayana, R., Reddy, S., Chaluvadi, M.R., Krishna, D.R. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 33, 2-16.
- Nardini, M., Daquino, M., Tomassi, G., Gentili, V., Difelice, M, Scaccini, C. (1995). Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. *Free Radical Biology and Medicine*, 19, 541–552.
- Nardini, M., Natella, F., Gentili, V., DiFelice, M., Scaccini, C. (1997). Effect of caffeic acid dietary supplementation on the antioxidant defense system in rat: an in vivo study. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 342, 157–160.
- Natella, F., Nardini, M., Giannetti, I., Dattilo, C., Scaccini, C. (2002). Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6211–6216.
- Nathan, C. (2003). Specificity of a third kind: ROS and N2 intermediates in cell signaling. *Journal of Clinical Investigation*, 111, 769-778.
- Neef, H., Declercq, P., Laekeman, G. (1995). Hypoglycaemic activity of selected European plants. *Phytotherapy Research*, 9, 45–48.
- Nenci, A., Becker, C., Wullaert, A., Gareus, R., van Loo, G., Danese, S., et al. (2007). Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature*, 446, 557–561.
- Nencu, I., Vlase, L., Istudor V, Dutu L E, Gird C E. (2012). Preliminary research regarding the therapeutic uses of *Urtica dioica* L. Note I. the polyphenols evaluation. *Farmacia*, 60(4), 493-500.
- Newberry, R.D., Stenson, W.F., Lorenz, R.G. (1999). Cyclooxygenase-2-dependent arachidonic acid metabolites are essential modulators of the intestinal immune response to dietary antigen. *Nature Medicine*, 5, 900–906.

- Niketić M., Tomović G. (1999). *Parietaria lusitanica* L. subsp. *lusitanica* u Stevanović V. uredn., Crvena knjiga vaskularne flore Srbije 1: 228-230.
- Nishikimi, M., Rao, N.A., Yagi, K. (1972). The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulphate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 46, 894–854.
- Oberholzer, M., Schambock, A., Rugendorff, E.W., Mihatsch, M., Rist, M., Buser, M., Heitz, U. (1986). Elektronenmikroskopische Ergebnisse bei medikamentös behandelter benigner Prostatahyperplasie (BPH): Klinisch experimentelle Konferenz Budapest, Jun 1986. In: Bauer, H.W. (Ed.), Benigne Prostatahyperplasie. Klinische und Experimentelle Urologie, *W Zuckschwerdt Verlag, San Francisco*, 14, 13–17.
- Obertreis, B., Giller, K., Teucher, T., Behnke, B., Schmitz, H. (1996a). Antiphlogistische Effekte von Extractum *Urticae dioicae foliorum* im Vergleich zu Kaffeoyläpfelsäure. *Arzneimittel-Forschung*, 46, 52–56.
- Obertreis, B., Rutkowski, T., Teucher, T., Behnke, B., Schmitz, H. (1996b). *Ex-vivo-in-vitro*-Hemmung der Lipopolysaccharid-stimulierten Tumor-Nekrose-Faktor- α - und Interleukin-1 β -Sekretion in humanem Vollblut durch Extractum *Urticae dioicae foliorum*. *Arzneimittel-Forschung*, 46, 389–394.
- Ohnishi, M., Morishita, H., Iwahashi, H., Toda, S., Shirataki, Y., Kimura, M., Kido, R. (1994). Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis. *Phytochemistry*, 36, 579–583.
- Oliver, F., Amon, E.U., Breathnach, A., Francis, D.M., Sarathchandra, P., Kobza Black, A., et al. (1991). Contact urticaria due to the common stinging nettle (*Urtica dioica*)—histological, ultrastructural and pharmacological studies. *Clinical and Experimental Dermatology*, 16, 1–7.
- Önal, S., Timur, S., Okutucu, B., Zihnioglu, F. (2005). Inhibition of Glucosidase by aqueous extracts of some potent antidiabetic medicinal herbs. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 35, 29-36.
- Ono, K., Han, J. (2000). The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signaling*, 12, 1–13.
- Orčić, D. (2010). Vrste tribusa Scandiceae (Apiaceae Lindley 1836, subfam. Apioideae) – potencijalni izvor biološki i farmakološki aktivnih sekundarnih biomolekula. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, Srbija.
- Orčić, D., Francišković, M., Bekvalac, K., Svirčev, E., Beara, I., Lesjak, M., Mimica-Dukić, N. (2014). Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food Chemistry*, 143, 48-53.
- Orhan, I., Kartal, M., Kan, Y., Sener, B. (2008). Activity of Essential Oils and Individual Components against Acetyl and Butyrylcholinesterase. *Zeitschrift für Naturforschung. Section C: Journal of Biosciences*, 63c, 547-553.
- Orhan, I., Sener, B., Choudhary, M.I., Khalid, A. (2004). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 91, 57-60.
- Oswiecimska, M., Komala, Z., Liszka, B. (1980). Sensitivity of *Paramecium primaurelia* and *Lepidium sativum* to extracts from *Folium Urticae*. *Folia Biologica*, 28, 245–251.
- Özen, T., Korkmaz, H. (2003). Modulatory effect of *Urtica dioica* L. (Urticaceae) leaf extract on biotransformation enzyme systems, antioxidant enzymes, lactate dehydrogenase and lipid peroxidation in mice. *Phytomedicine*, 10, 405–415.
- Paccaud, J.P., Schifferli, J.A., Baggiolini, M. (1990). NAP-1/IL-8 induces up-regulation of CR1 receptors in human neutrophil leukocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 166, 187-192.

- Pace-Asciak, C.R., Harm, S., Diamandis, E.P., Soleas, G., Goldberg, D.M. (1995). The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clinica Chimica Acta*, 235, 207–219.
- Pageot, L.P., Perreault, N., Basora, N., Francoeur C, Magny P, Beaulieu JF. (2000). Human cell models to study small intestinal functions: recapitulation of the crypt-villus axis. *Microscopy Research and Technique*, 49(4), 394-406.
- Park, B.Y., Min, B.S., Kwon, O.K., Oh, S.R., Ahn, K.S, Kim, T.J., et al. (2004). Increase of caspase-3 activity by lignans from *Machilus thunbergii* in HL-60 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27, 1305-1307.
- Pasparakis, M. (2009). Regulation of tissue homeostasis by NFkappaB signalling: implications for inflammatory diseases. *Nature Reviews: Immunology*, 9, 778–788.
- Patten, G. (1993). *Urtica*. *Australian Journal of Herbal Medicine*, 5, 5–9.
- Pearce, G.J., Chikanza, I.C., McCloskey, D.J. (1999). The *in vitro* effects of a water soluble extract of the stinging nettle (*Urtica dioica folium*) leaf preparation Reuma-Hek(R) on TNF α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 production by blood monocytes. *Arthritis and Rheumatism*, 42, S80.
- Pellegrini, N., Valtuena, S., Ardigo, D., Brighenti, F., Franzini, L., Del Rio, D. et al. (2010). Intake of the plant lignans matairesinol, secoisolariciresinol, pinoreosinol, and lariciresinol in relation to vascular inflammation and endothelial dysfunction in middle age-elderly men and post-menopausal women living in Northern Italy. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 20, 64-71
- Peveri, P., Walz, A., Dewald, B., Baggiolini, M. (1988). A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 167, 1547-1559.
- Pieroni, A., Janiak V., Dürr CM, Lüdeke S, Traschsel E, Heinrich M. (2002). *In vitro* antioxidant activity of non-cultivated vegetables of ethnic Albanians in southern Italy. *Phytotherapy Research*, 16, 467–473.
- Pilger, C., Bartolucci, C., Lamba, D., Tropsha, A., Fels, G. (2001). Accurate prediction of the bound conformation of galanthamine in the active site of torpedo californica acetylcholinesterase using molecular docking. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 19, 288-296.
- Pinelli, P., Ieri, F., Vignolini P, Bacci L, Baronti S, Romani A. (2008). Extraction and HPLC analysis of phenolic compounds in leaves, stalks and textile fibers of *Urtica dioica* L. *Journal of Agricultural chemistry*, 56, 9127-9132.
- Pohanka, M., Kuca, K., Kassa, J. (2008). New performance of biosensor technology for Alzheimer's disease drugs: *in vitro* comparison of tacrine and 7-methoxytacrine. *Neuroendocrinology Letters*, 29, 755-758.
- Poljšak, B., Raspor, R. (2008). The antioxidant and pro-oxidant activity of vitamin C and trolox *in vitro*: a comparative study. *Journal of applied toxicology*, 28, 183–188.
- Prabhakar, M.C., Bano, H., Kumar, I., Shamsi, M.A., Khan, M.S. (1981). Pharmacological investigations on vitexin. *Planta Medica*, 43(4), 396–403.
- Prieto, J. M., Giner, R.M., Recio, M. C., Schinella, G., Manez, S., Rios, J. L. (2002). Diphyllin acetylapioside, a 5-lipoxygenase inhibitor from *Haplophyllum hispanicum*. *Planta Medica*, 68, 359-360.
- Quaroni, A., Hochman, J. (1996). Development of intestinal cell culture models for drug transport and metabolism studies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 22, 3-52.
- Quaroni, A., Wands, J., Trelstad, R., Isselbacher, K. (1979). Epithelioid cell cultures from rat small intestine. *Journal of Cell Biology*, 248-265.

- Quinn, D.M. (1987). Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Review*, 87(5), 955–979.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118, 229–241.
- Ramm, S., Hansen, C. (1997). Arthrose: Brennesselblätter-Extrakt IDS23 spart NSAR. *Jatros Orthopedics*, 12, 29–33.
- Randall, C., Dickens, A., White, A., Sanders, H., Fox, M., Campbell, J. (2008). Nettle sting for chronic knee pain: a randomised controlled pilot study. *Complementary Therapies in Medicine*, 66–72.
- Randall, C., Meethan, K., Randall, H., Dobbs, F. (1999). Nettle sting of *Urtica dioica* for joint pain – an exploratory study of this complementary therapy. *Complementary Therapies in Medicine*, 7, 126–131.
- Randall, C., Randall, H., Dobbs, F., Hutton, C., Sanders, H. (2000). Randomized controlled trial of nettle sting for treatment of base-of-thumb pain. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 93, 305–309.
- Rang, H., Dale, M., Ritter, J., Moore, P. (2004). Farmakologija, peto izdanje, Data Status, Beograd, Republika Srbija.
- Rau, O., Wurglics, M., Dingermann, T., Abdel Tawab, M., Schubert-Zsilavec, M. (2006). Screening of herbal extracts for activation of the human peroxisome proliferator-activated receptor. *Pharmazie*, 61, 952–956.
- Rausch, U., Aumüller, G., Eicheler, W., Gutschank, W., Beyer, G., Ulshofer, B. (1992). Der Einfluss von Phytopharmaka auf BPH-Gewebe und Explantatkulturen in vitro. In: Rautishausen, G. (Ed.), Benigne Prostatahyperplasie III. Klinische und Experimentelle Urologie. *W Zuckschwerdt Verlag, New York*, 22, 116–123.
- Recio, M.C., Andújar, I., Ríos, J.L. (2012). Anti-inflammatory agents from plants: progress and potential. *Current Pharmaceutical Design*, 19, 2088–2103.
- Rescigno M. (2011). The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. *Trends in Immunology*, 32(6), 256-264.
- Reynolds, J.E.F., (1996). Martindale - The Extra Pharmacopoeia, 31st ed The Royal Pharmaceutical Society, Council of the Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, London.
- Rhee, D.J., Katz, L.J., Spaeth, G.L., Myers, J.S. (2001). Complementary and Alternative Medicine for Glaucoma. *Survey of Ophthalmology*, 46, 43-55.
- Rhodes, L., Primka, R., Berman, C., Vergult, G., Gabriel, M., Malice, M., Gibelin, B. (1993). Comparison of finasteride (Proscars), a 5 α -reductase inhibitor, and various commercial plant extracts in *in vitro* and *in vivo* 5 α -reductase inhibition. *Prostate*, 22, 43–51.
- Rice-Evans, C. (1999). Screening of phenolics and flavonoids for antioxidant activity. In Antioxidant Food Supplements in Human Health; Packer, L., Hiramatsu, M., Yoshikawa, T., Eds.; Academic Press: San Diego, CA.
- Riehemann, K., Behnke, B., Schulze-Osthoff, K. (1999). Plant extracts from stinging nettle (*Urtica dioica*), an antirheumatic remedy, inhibit the proinflammatory transcription factor NF-kappaB. *FEBS*, 442, 89–94.
- Rimm, E.B., Katan, M.B., Ascherio, A., Stamper, M.J., Willett, W.C. (1996). Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Annals of Internal Medicine*, 125, 384–389.

- Roman-Ramos, R., Alarcon-Auula, F., Lara-Lemus, A., Flores-Saenz, J.L. (1992). Hypoglycemic effect of plants used in Mexico as antidiabetics. *Archives of Medical Research*, 23, 59–64.
- Romier, B., Schneider, Y.J., Larondelle, Y., During, A. (2009). Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. *Nutrition Reviews*, 67(7), 363–378.
- Ruckle, E. (1950). Brennesselwurzel-Tee bei beginnender Prostatitis. *Hippokrates*, 21, 57–66.
- Russo, N., Toscano, M., Uccella, N. (2000). Semiempirical molecular modeling into quercetin reactive site: structural, conformational, and electronic features. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 48, 3232–3237.
- Sajid, T.M., Rashid, S., Saeed, S.A. Inhibition of adrenaline-induced aggregation of human platelets by Pakistani medicinal plants. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4, 145–152.
- Saleem, M., Kim, H., Alic, M.S., Lee, Y.J. (2005). An update on bioactive plant lignans. *Natural Product Reports*, 22, 696–716.
- Sanchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Science and Technology International*, 8(3), 121–137.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J.A, Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270–276.
- Sanders, S.K., Crean, S.M., Boxer, P.A., Kellner, D., LaRosa, G.J., Hunt, S.W. (2000). Functional differences between monocyte chemotactic protein-1 receptor A and monocyte chemotactic protein-1 receptor B expressed in a Jurkat T cell. *Journal of Immunology*, 165, 4877–4883.
- Schmidt, K. (1983). Die Wirkung eines Radix Urticae-Extrakts und einzelner Nebenextrakte auf das SHBG des Blutplasmas bei der benignen Prostatahyperplasie. *Fortschritte der Medizin*, 21, 713–716.
- Schmitt, J. (1987). Cell culture of prostatic stromal tissue. In: Bauer, H.W. (Ed.), Benigne Prostatahyperplasie, Klinisch experimentelle Konferenz, Budapest, Jun 1986, Series: Klinische und Experimentelle Urologie. *W Zuckschwerdt Verlag, San Francisco*, 14, 18–22.
- Schneider, H., Simmering, R., Hartmann, L., Pforte, H., Blaut, M. (2000). Degradation of quercetin-3-glucoside in gnotobiotic rats associated with human intestinal bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 1027–1037.
- Schottner, M., Ganber, D., Spiteller, G. (1997a). Lignans from the roots of *Urtica dioica* and their metabolites bind to human sex hormone binding globulin (SHBG). *Planta medica*, 63, 529–532.
- Schottner, M., Reiner, J., Tamayan, F. (1997b). (+)-neo-olivil from roots of *Urtica dioica* L. *Phytochemistry*, 45(6), 1107–1109.
- Schulze-Tanzil, G., de Souza, P., Behnke, B., Klingelhofer, S., Scheid, A., Shakibaei, M. (2002). Effects of the antirheumatic remedy Hox alpha - a new stinging nettle leaf extract-on matrix metalloproteinases in human chondrocytes *in vitro*. *Histology and Histopathology*, 17, 477–485.
- Shao, L., Kamalu, O., Mayer, L. (2005). Non-classical MHC class I molecules on intestinal epithelial cells: mediators of mucosal crosstalk. *Immunological Reviews*, 206, 160–176.
- Shen, S.C., Lee, W.R., Lin, H.Y., Huang, H.C., Ko, C.H., Yang, L.L., Chen, Y.C. (2002). *In vitro* and *in vivo* inhibitory activities of rutin, wogonin, and quercetin on lipopolysaccharide induced nitric oxide and prostaglandin E2 production. *European Journal of Pharmacology*, 446, 187–194.
- Singer, I.I., Kawka, D.W., Schloemann, S., Tessner, T., Riehl, T., Stenson, W.F. (1998). Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 115, 297–306.

- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152–178.
- Smallman, B.N., Manedkjee, A. (1981). The synthesis of acetylcholine by plants. *Biochemical Journal*, 194, 361–364.
- Smyth, E.M., Grosser, T., Wang, M., Yu, Y. Gerald, G.F. (2009). Prostanoids in health and disease. *Journal of Lipid Research*, 50, 423-429.
- Stahl, S.M. (2000). The new cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease, part 2: illustrating their mechanisms of action. *Journal of Clinical Psychiatry*, 61, 813-814.
- Standiford, T.J., Kunkel, S.L., Phan, S.H., Rollins, B.J., Strieter, R.M. (1991). Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 9912–9918.
- Stanley Mainzen Prince, P., Kamalakkannan, N. (2006). Rutin improves glucose homeostasis in streptozotocin diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 20, 96–102.
- Starkenstein, E., Wasserstrom, Th. (1933). Pharmakologische und chemische Untersuchungen über die wirksamen Bestandteile der *Urtica dioica* und *Urtica urens*. *Prague: Dtsch Univ Prague*, 27, 137-148.
- Stefanvic, D. (2000). Reumaticne i srodne bolesti-dijagnoza i terapija Vojnoizdavacki zavod: INFOhome, Beograd, Srbija.
- Stenson, W.F. (2007). Prostaglandins and epithelial response to injury. *Current Opinion in Gastroenterology*, 23, 107–110.
- Streber, A.S. (1986). Benigne Prostatahyperplasie: Brennesselextrakt stoppt Wucherung. *Aerztliche Praxis*, 87, 3–7.
- Strieter, R.M., Polverini, P.J., Kunkel, S.L., Arenberg, D.A., Burdick, M.D., Kasper, J. (1995). The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 27348–27357.
- Sudeep, G., Wang, Y., Mathew, S., Srinivasan, K., Khurana, S. (2007). Dimerization and Actin-bundling Properties of Villin and Its Role in the Assembly of Epithelial Cell Brush Borders. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(36), 26528–26541.
- Suknović, N. (2012). Primena hidrolitičkih metoda u analizi flavonoidnih glikozida, diplomski rad. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija.
- Suzuki, T., Honda, Y., Mukasa, Y. (2005). Effects of UV-B radiation, cold and desiccation stress on rutin concentration and rutin glucosidase activity in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) leaves. *Plant Science*, 168, 1303–1307.
- Swanston-Flatt, S.K., Day, C., Flatt, P., Gould, B., Bailey, C.J. (1989). Glycaemic effects of traditional European plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetes Research*, 10, 69–73.
- van der Schouw, Y.T., de Kleijn, M.J., Peeters, P.H., Grobbee, D.E. (2000). Phyto-oestrogens and cardiovascular disease risk. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 10, 154-167.
- Tahri, A., Yamani, S., Legssayer, A., Aziz, M., Mekhfi, H., Bnouham, M., et al. (2000). Acute diuretic, natriuretic and hypotensive effects of a continuous perfusion of aqueous extract of *Urtica dioica* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 73, 95–100.

- Takhtajan, A.L. (2009). *Diversity and Classification of Flowering Plants* 2nd ed. Springer, Berlin.
- Tanaka, T., Mori, H. (1995). Prevention of experimental tumorigenesis in colon, liver and oral cavity by dietary chlorogenic and caffeic acids, in *Seizeame Colloque Scientique International sur le Cafea.*, ASIC, Paris.
- Tang, H., Zhao, L.Z., Zhao, H.T., Huang, S.L., Zhong, S.M., Qin, J.K., et al. (2011). Hybrids of oxoisoalloxazine-tacrine congeners: Novel acetylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced β -amyloid aggregation inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 4970-4979.
- Tatić B., Petković B. (2012). *Urticaceae* Jussieu, u Stevanović V. uredn., *Flora Srbije* 2. izd., II: 88 – 99. SANU, Beograd.
- Tayeb, H.O., Yang, H.D., Price, B.H., Tarazi, F.I. (2012). Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors. *Pharmacology and Therapeutics*, 134, 8-25.
- Teucher, T., Obertreis, B., Ruttkowski, T., Schmitz, H. (1996). Zytokin-Sekretion im Vollblut gesunder probanden nach oraler Einnahme eines *Urtica dioica* L. - Blattextraktes. *Arzneimittel Forschung*, 46, 906–910.
- Thelen, M., Peveri, P., Kernen, P., Von Tscharnher, V., Walz, A., Baggiolini, M. (1988). Mechanism of action of neutrophil activation by NAF, a novel monocyte-derived peptide agonist. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2, 2702-2706.
- Thompson, P.A., Wright, D.E., Counsell, C.E., Zajicek, J. (2012). Statistical analysis, trial design and duration in Alzheimer's disease clinical trials: a review. *International Psychogeriatrics*, 24, 689-697.
- Tita, B., Faccendini, P., Bello, U., Martinoli, L., Bolle, P. (1993). *Urtica dioica* L.: pharmacological effect of ethanol extract. *Pharmacological Research*, 27, 21–22.
- Toldy, A., Stdler, K., Sasvari, M., Jakus, J., Jung, K.J., Chung, H.Y., et al. (2005). The effect of exercise and nettle supplementation on oxidative stress markers in the rat brain. *Brain Research Bulletin*, 65, 487–493.
- Tougu, V. (2001). Acetylcholinesterase: Mechanism of Catalysis and Inhibition. *Current Medicinal Chemistry – Central Nervous System Agents*, 1, 155-170.
- Tripathi, A., Srivastava, U.C. (2008). Acetylcholinesterase: a versatile enzyme of nervous system. *Annals of Neurosciences*, 15, 106-111.
- Türkdogan, M.K., Ozbek, H., Yener, Z., Tuncer, I., Uygan, I., Ceylan, E. (2003). The role of *Urtica dioica* and *Nigella sativa* in the prevention of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Phytotherapy Research*, 17, 942–946.
- Turker, A.U., Usta, C. (2008). Biological screening of some Turkish medicinal plant extracts for antimicrobial and toxicity activities. *Natural Product Research*, 22, 136–146.
- Tuttolomondo, T., Licata, M., Leto, C., Gargano, M.L., Venturella, G., La Bella, S. (2014). Plant genetic resources and traditional knowledge on medicinal use of wild shrub and herbaceous plant species in the Etna Regional Park (Eastern Sicily, Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, 155, 1362–1381.
- Umar, S., Mishra, N.K., Pal, K., Sajad, M., Neha, Ansari, M.M., Ahmad, S., et al. (2012). Protective effect of rutin in attenuation of collagen-induced arthritis in Wistar rat by inhibiting inflammation and oxidative stress. *Indian Journal of Rheumatology*, 7, 191–198.
- Upton, R. (2013). Stinging nettles leaf (*Urtica dioica* L.): Extraordinary vegetable medicine, *Journal of herbal medicine*, 3, 9-38.

- Uriarte-Pueyo, I., Calvo, M.I. (2011). Flavonoids as Acetylcholinesterase Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 18, 5289-5302.
- Van der Logt, E.M., Roelofs, H.M., Nagengast, F.M., Peters, W.H. (2003). Induction of rat hepatic and intestinal UDP glucuronosyltransferases by naturally occurring dietary anticarcinogens. *Carcinogenesis*, 24, 1651–1656.
- Vermerris, W., Nicholson, R. (2006). Phenolic compound biochemistry, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Viali, D.M., Barbeta, F., Zanotti, L., Mihalyi, K. (1973). Estendibilita del concetto di sistema cellulare enterocromaffine ai vegetali. I. Inquadramento della questione e contributo alla conoscenza istochimica dei peli di *Urtica dioica* L. *Acta Histochemica*, 45, 270–280.
- Vibes, J., Lasserre, B., Gleye, J., Declume, C. (1994). Inhibition of Thromboxane A2 Biosynthesis In Vitro by the Main Components of *Crataegus Oxyacantha* (Hawthorn) Flower Heads. *Prostaglandins, leucotriens and essential fatty acids*, 50, 173-175.
- Vijay-Kumar, M., Sanders, C. J., Taylor, R. T., Kumar, A., Aitken, J.D., Sitaraman, S.V., et al. (2007). Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 117, 3909–3921.
- Vincentini, O., Ciotta, C., Bignami, M., Stamatii, A., Zucco, F. (1996). Normal rat intestinal cells IEC-18: characterisation and transfection with immortalizing oncogenes. *Cytotechnology*, 21, 11-19.
- Vontobel, H.P., Herzog, R., Rutishauser, G., Kreis, H. (1985). Ergebnisse einer Doppelblindstudie über die Wirksamkeit von ERU-Kapseln in der konservativen Behandlung der benignen Prostatahyperplasie. *Urologe A*, 24, 49–51.
- Waetzig, G.H., Schreiber, S. (2003). Review article: mitogen-activated protein kinases in chronic intestinal inflammation – targeting ancient pathways to treat modern diseases. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 18, 17–32.
- Wagner, H., Geiger, W.N., Boos, G., Samtleben, R. (1995). Studies on the binding of *Urtica dioica* agglutinin (UDA) and other lectins in an in vitro epidermal growth factor receptor test. *Phytomedicine*, 4, 287–290.
- Wagner, H., Willer, F., Samtleben, R., Boos, G. (1994). Search for the antiprostatic principle of stinging nettle (*Urtica dioica*) roots. *Phytomedicine*, 1, 213–214.
- Wallace, J.L. (2006). COX-2: a pivotal enzyme in mucosal protection and resolution of inflammation. *Scientific World Journal*, 6, 577–588.
- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J., Chen, Z.J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*, 412, 346–351.
- Wanga, G.F., Shia, L.P., Rena, Y.D., Liub, Q.F., Liuc, H.F., Zhangb, R.J., et al. (2009). Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid *in vivo* and *in vitro*. *Antiviral Research*, 83, 186–190.
- Wantoch, H. (1935). Die Brennessel als Diuretikum. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 1, 508.
- Watkins, P.B., Zimmerman, H.J., Knapp, M.J., Gracon, S.I., Lewis, K.W. (1994). Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's-Disease. *Journal of the American Medical Association (JAMA)*, 271(13), 992-998.

- Watkins, P.B.; Zimmerman, H.J.; Knapp, M.J.; Gracon, S.I.; Lewis, K.W. (1994). Hepatotoxic Effects of Tacrine Administration in Patients With Alzheimer's Disease. *Journal of the American Medical Association (JAMA)*, 271, 992-998.
- Webster, R.P., Gawde, M.D., Bhattacharya, R.K. (1996). Protective effect of rutin, a flavonol glycoside, on the carcinogen-induced DNA damage and repair enzymes in rats. *Cancer Letters*, 109, 185–191.
- Werner, T., Haller, D. (2007). Intestinal epithelial cell signalling and chronic inflammation: from the proteome to specific molecular mechanisms. *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 622, 42–57.
- Wessler, I., Kirkpatrick, C.J. (2008). Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *British Journal of Pharmacology*, 154, 1558-1571.
- Wettstein D. (1957). Chlorophyll – letale und der submikroskopische Form wechsel der Plastiden. *Experimental Cell Research*, 12, 427–487.
- Whittaker, V. P. (1986). The storage and release of acetylcholine, *Trends in Pharmacological Sciences*, 312-315.
- Whittaker, V. P. (1990). The contribution of drugs and toxins to understanding of cholinergic function. *Trends in Pharmacological Sciences*, 11, 8-13.
- Wichtl M, ed. (2004). Brinckmann JA, Lindenmaier MP, translators. Herbal drugs and phytopharmaceuticals. 3rd ed. Boca Raton: CRC.
- Wilhelm, O. (1885). Thomé Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz, Gera, Germany. (slika 2.1. - *Urtica dioica*).
- Willer, F. (1992). Chemie und Pharmakologie der Polysaccharide und Lektine von *Urtica dioica* (Lin.). Dissertation, Ludwig Maximilians Universität München, Augsburg, available from Maximilians Universität München, Ludwig.
- Willer, F., Wagner, H. (1990). Immunologically active polysaccharides and lectins from the aqueous extracts of *Urtica dioica*. *Planta Medica*, 56, poster 669.
- Williams, P., Sorribas, A., Howes, M.J.R. (2011). Natural products as a source of Alzheimer's drug leads. *Natural Product Reports*, 28, 48-77.
- Wilt, T.J., Ishani, A., Rutks, I., MacDonald, R. (2000). Phytotherapy for benign prostatic hyperplasia. *Public Health Nutrition*, 3, 459–472.
- Winblad, B., Kilander, L., Eriksson, S., Minthon, L., Båtsman, S., Wetterholm, A.L., et al. (2006). Donepezil in patients with severe Alzheimer's disease: double-blind, parallel-group, placebo-controlled study. *Lancet*, 367(9533), 1057-1065.
- Winblad, B., Grossberg, G., Frolich, L., Farlow, M., Zechner, S., Nagel, J., Lane, R. (2007). IDEAL: A 6-month, double-blind, placebocontrolled study of the first skin patch for Alzheimer disease. *Neurology*, 69, S14-S22.
- Winkel-Shirley, B. (2001). Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiology*, 126, 485–493.
- Winter, J., Moore, L.H., Dowell Jr, V.R., Bokkenheuser, V.D. (1989). C-Ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1203–1208.
- Wolf, F., Gulbin, K., Mleke, F. (2001). Aktivierte Arthrose: Brennesselblätter-Extrakt mit Leitsubstanz HOTrE (STRAT 59) hummt tumor-Nekrose-Faktor-a. *Kassenarzt*, 16, 42–47.

- Wolters, S., Bittmann, F., Kummer, V. (2005). The first subfossil records of *Urtica kioviensis* Rogow. and their consequences for palaeoecological interpretations. *Vegetation History and Archaeobotany*, 14, 518–527.
- Woodville, W. (1810). *Medical Botany*. London: William Philips.
- World Health Organization (WHO): Effects of organophosphorus insecticides on the nervous system. In: *Organophosphorus Insecticides: a General Introduction*; Geneva, 1986; pp. 58-69.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., et al. (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, 301, 640–643.
- Yan, J., Sun, L., Wua, G., Yi, P., Yang, F., Zhou, L., et al. (2009). Rational design and synthesis of highly potent anti-acetylcholinesterase activity huperzine A derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17, 6937-6941.
- Yang, J., Juan Guo, J., Yuan, J. (2008). *In vitro* antioxidant properties of rutin. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 1060–1066.
- Zeev, B., Mordehai, T., Rydberg, E.H., Solomon, A., Toker, L., Vanessa J., et al. (2003). The intra cellular domain of the *Drosophila* cholinesterase. Like neural adhesion protein, gliotactin, is natively unfolded. *Protein*, 53, 750-767.
- Zenk, M.H. (1996). Heavy metal detoxification in higher plants - a review. *Gene*, 179: 21-30.
- Ziegler, H. (1982). Zytomorphologische Untersuchung der benignen Prostatahyperplasie unter Behandlung mit Extract. *Radiciis Urticae* (ERU). *Fortschritte der Medizin*, 39, 1832–1834.
- Zlotnik, A., Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 12, 121–127.

8. Prilog

8.1. PODACI O PRIPREMI METANOLNIH EKSTRAKATA

Tabela 8.1. Odvage i prinos ekstrakata pripremljenih maceracijom na sobnoj temperaturi (48h) pomoću 80% MeOH.

Oznaka vrste	Deo biljke	m _{droge} [g]	m _{suvog ostatka} [g]	Prinos [%]	V _{DMSO} [mL]	m _{nakon tt ekstrakcije} [g]*	Prinos [%]	V _{DMSO} [mL]	C _{ekstrakta} [mg/mL]
U. dio1 (pub)	Herba	19,9302	2,3664	11,87		1,8574	9,32	9,29	200
	Koren	20,0385	1,7121	8,544	8,56				200
	List	9,9304	1,0459	10,53		0,7431	7,48	3,72	200
	Stabljika	20,7262	2,0066	9,681	10,03				200
	Cvet	5,9613	1,0521	17,65	5,26				200
U. dio3 (pub)	Herba	9,9702	1,3892	13,93		1,1210	11,24	5,61	200
	Koren	20,2239	1,2443	6,15	6,22				200
U. dio4 (pub)	Herba	20,1020	2,5060	12,47		2,1185	10,54	10,59	200
	Koren	9,1406	0,7137	7,81	3,57				200
	List	10,2803	1,2874	12,52		0,9912	9,64	4,96	200
	Stabljika	1,0611	0,1061	10,01	0,53				200
	Cvet	0,9803	0,1591	16,23	0,80				200
U. dio5 (dio)	Herba	20,0103	2,3557	11,77		0,7822	3,91	3,91	200
	Koren	19,9605	1,5679	7,855	7,84				200
	List	15,2903	2,0691	13,53		1,4979	9,80	7,49	200
	Stabljika	5,0505	0,5034	9,97	5,04				100
	Cvet	3,9303	0,5529	14,07	2,76				200
U. dio6 (pub)	Herba	20,0502	2,6716	13,32		2,2541	11,24	11,27	200
	Koren	8,6101	0,6594	7,66	3,30				200
	List	15,0610	2,4133	16,02		1,8904	12,55	9,45	200
	Stabljika	0,9709	0,084	8,65	0,42				100
	Cvet	3,0630	0,3576	11,67	1,79				200
U. dio7 (dio)	Herba	20,5201	3,3718	16,43		2,8738	14,00	14,37	200
	Koren	8,7890	0,6994	7,96	3,50				200
	List	12,1906	1,7847	14,64		1,1331	9,30	5,67	200
	Stabljika	0,9237	0,0732	7,92	0,73				100
	Cvet	1,246	0,2399	19,25	1,20				200

Oznaka vrste	Deo biljke	m _{droge} [g]	m _{suvog ostatka} [g]	Prinos [%]	V _{DMSO} [mL]	m _{nakon tt ekstrakcije} [g]*	Prinos [%]	V _{DMSO} [mL]	C _{ekstrakta} [mg/mL]
U. dio8 (pub)	Herba	20,3910	2,7159	13,32		2,395	11,75	11,98	200
	Koren	15,3614	1,3501	8,79	6,75				200
	List	5,1103	1,0025	19,62		0,8333	16,31	4,17	200
	Stabljika	0,9462	0,1003	10,60	0,50				100
	Cvet	1,0182	0,0899	8,83	0,90				100
U. kioviensis	Herba	19,9902	4,3569	21,80		3,4953	17,49	17,48	200
	Koren	20,0211	0,9939	4,96	4,97				200
	List	10,9210	2,4292	22,25		1,8017	16,50	9,01	200
	Stabljika	0,9903	0,1127	11,38	1,13				100
P. officinalis1	Herba	13,0506	1,2772	9,79		1,0320	7,91	5,16	200
	Koren	3,4703	0,4762	13,72	2,38				200
	List	0,9705	0,0677	6,979	0,68				100
	Stabljika	8,4508	0,7897	9,35	3,95				200
	Cvet	0,7211	0,1017	14,13	1,02				100
P. officinalis2	Herba	20,3107	2,0132	9,91		1,6512	8,13	8,26	200
	Koren	10,8009	1,4112	13,07	7,06				200
	List	10,0403	0,8808	8,77		0,6381	6,36	3,19	200
	Stabljika	1,0107	0,1042	10,32	1,04				100
	Cvet	0,9722	0,0996	10,27	1,00				100
P. officinalis3	Herba	10,0506	1,6604	16,52		1,3178	13,11	6,59	200
	Koren	6,7404	0,7755	11,51	3,88				200
	List	6,0309	1,1829	19,62		0,9396	15,58	4,70	200
	Stabljika	9,9800	1,6073	16,11	8,04				200
	Cvet	4,7012	1,0175	21,65	5,09				200
P. officinalis4	Herba	10,1906	1,1952	11,73		0,9384	9,209	4,69	200
	Koren	6,4703	0,7204	11,13	3,602				200
	List	8,1109	0,9081	11,20		0,4973	6,13	2,486	200
	Stabljika	6,0211	0,5407	8,98	2,703				200
	Cvet	1,0507	0,1716	16,34	0,858				200

Oznaka vrste	Deo biljke	m _{droge} [g]	m _{suvog ostatka} [g]	Prinos [%]	V _{DMSO} [mL]	m _{nakon tt ekstrakcije} [g]*	Prinos [%]	V _{DMSO} [mL]	C _{ekstrakta} [mg/mL]
P. judaica1	Herba	20,0006	2,1320	10,66		1,7281	8,64	8,64	200
	Koren	10,0206	0,6481	6,48	3,24				200
	List	10,0811	1,2917	12,81		0,8599	8,53	4,30	200
	Stabljika	20,0069	1,7566	8,78	8,78				200
	Cvet	19,9981	0,6915	3,46	3,46				200
P. judaica2	Herba	20,4206	2,9936	14,66		2,1758	10,66	10,88	200
	Koren	0,8370	0,0676	8,08	0,34				100
	List	1,2047	0,1684	13,98	0,84				100
	Stabljika	0,6824	0,0501	7,34	0,25				100
	Cvet	0,1981	0,0170	8,58	0,09				50
P. lusitanica1	Herba	16,4603	2,7117	16,47		2,2956	13,95	11,48	200
	Koren	0,7406	0,1183	15,99	0,59				200
	List	1,2911	0,1494	11,58	0,75				100
	Stabljika	0,7111	0,0909	12,80	0,45				100
	Cvet	0,4806	0,0582	12,13	0,29				100
P. lusitanica2	Herba	9,5506	1,9021	-		1,424	14,91	7,12	200
	Koren	2,0709	0,2809	13,56	1,4				200
	List	0,9852	0,1752	17,78	0,88				200
	Stabljika	0,8361	0,0854	-	0,43				200
P. serbica	Herba	11,3009	0,8434	7,46		0,4869	-	2,43	200

*masa suvog ostatka vodene frakcije nakon tečno-tečne ekstrakcije sa heksanom.

8.2. PODACI O PRIPREMI INFUZA (VODENIH EKSTRAKATA)

Tabela 8.2. Odvage i prinos infuza pripremljenih po recepturi za čaj – ekstrakcija prelivanjem sa 60 mL vrele vode i mućkanjem u toku 10 minuta.

Oznaka vrste	Deo biljke	m_{droge} [g]	$m_{\text{suvog ostatka}}$ [g]	Prinos [%]	$V_{\text{DMSO:H}_2\text{O} = 1:1}$ [mL]	$C_{\text{ekstrakta}}$ [mg/mL]
U. dio1 (pub)	herba	0,5855	0,1137	19,42	2,274	50
	koren	0,598	0,0957	16,00	1,914	50
	list	0,6238	0,131	21,00	2,620	50
P. judaica1	herba	0,5962	0,103	17,28	2,060	50
	koren	0,5984	0,0279	4,662	0,558	50
	list	0,5909	0,1236	20,917	2,47	50
P. lusitanica1	herba	0,599	0,1442	24,073	2,88	50
	list	0,6116	0,1761	28,793	3,52	50
P. officinalis2	herba	0,594	0,1128	18,99	2,26	50
	list	0,6065	0,1015	16,74	2,03	50
P. officinalis3	herba	0,599	0,1442	24,073	2,88	50
	list	0,6116	0,1761	28,793	3,52	50

Infuzi korišćeni u testu za procenu antiinflamatorne aktivnosti.

U. dio1 (pub)	herba	0,5991	0,1061	17,71	2,122	50
U. dio6 (pub)	herba	0,6093	0,1315	21,58	2,630	50
P. judaica1	herba	0,5971	0,1092	18,29	2,184	50
P. judaica2	herba	0,5984	0,1368	22,86	2,736	50
P. officinalis1	herba	0,5956	0,121	20,32	2,420	50
P. officinalis2	herba	0,5964	0,1061	17,71	2,122	50
P. lusitanica1	herba	0,6024	0,1237	20,53	2,474	50

8.3. REZULTATI KVALITATIVNE LC-DAD-MS i LC-MS/MS ANALIZE

Tabela 8.3. Spisak jedinjenja kojima je identifikovana molekulska masa (rezultati UV, MS¹ i MS² analize), i njihova zastupljenost u metanolnim ekstraktima (slike UV, MS¹ i MS² spektara su dati u *Dodatnom materijalu* na CD-u).

Pik	tr	Mw	UV	Precursor Ion m/z	Mode	V _{col} (V)	Produkt jon m/z, relativni udeo	U. dió, - H	U. dió, - K	U. kíó, - H	U. kíó, - K	P. jud, - H	P. jud, - K	P. lus, - H	P. lus, - K	P. off, - H	P. off, - K											
P1	0,48	342	-	365	PI	10	277(11), 203(100), 185(41)	√	√	√		√	√	√	√	√	√											
							20	365(20), 203(100), 185(98)																				
							30	203 (100)																				
							40	-																				
				- disaharid				377	NI	10	341 (100), 215 (8)																	
											20	377(5), 341(100), 179(33), 161(9), 119(17), 89(11)																
											30	119(63), 113(56), 101(45), 89(100), 71(32), 59(74)																
											40	89(45), 71(49), 59(100)																
											P2	0,52	192	prekolpljen	191	NI	10	111(100), 87(25), 85(18)	√	√								
																		20	111(100), 87(75), 85(36), 67(21), 57(12)									
30	191(12), 111(70), 87(82), 85(37), 67(100), 59(6), 57(49)																											
40	111(19), 87(94), 85(9), 67(100), 59(33), 57(84)																											
P3	0,58	293	prekolpljen	294	PI	10	276 (100), 258 (41), 230 (26), 132 (12)	√	√	√																		
							20	276 (16), 258 (53), 230 (100), 212 (33), 132 (26), 97 (18), 88 (20), 86 (65)																				
							30	230(48), 212(25), 112(45), 98(39), 97(40), 88(39), 87(37), 86(100), 69(92)																				
							40	230(56), 212(25), 128(37), 112(45), 98(36), 97(42), 88(33), 87(52), 86(50), 69(100), 59(50), 57(41)																				
				- hinska kiselina				292	NI	10	202(6), 172(36), 130(100)																	
											20	172(14), 130(100)																
											30	130 (100)																
											40	130 (100)																
											P4	0,65	578	prekolpljen	579	PI	10	427(66), 409(66), 301(14), 291(100), 289(57), 271(15), 247(22), 139(26), 127(33)								√		
																		20	427(9), 409(46), 291(37), 289(25), 287(52), 275(31), 271(31), 163(35), 139(71), 127(100), 123(35)									
30	287(29), 275(27), 271(25), 247(18), 163(32), 139(60), 127(100), 123(29)																											
40	287(30), 247(21), 163(30), 139(66), 135(27), 127(100), 123(38)																											
577	NI	10	577(8), 451(6), 425(100), 407(21), 289(24), 244(3), 125(4)																									
			20	577(22), 451(10), 425(55), 407(100), 289(93), 125(15)																								
						30	407(100), 339(8), 289(63), 245(20), 205(6), 161(30), 125(57)																					
							40	407(100), 339(19), 289(13), 256(18), 245(44), 205(33), 203(51), 165(41), 161(47), 125(61), 109(10)																				

Pik	tr	Mw	UV	Precursor Ion m/z	Mode	V _{col} (V)	Produkt jon m/z, relativni udeo	U. dio, - H	U. dio, - K	U. kio, - H	U. kio, - K	P. jud, - H	P. jud, - K	P. lus, - H	P. lus, - K	P. off, - H	P. off, - K										
P5	0,69	327	-	328	PI	10	310(100), 292(48), 264(21), 178(10), 166(24), 120(7)	√	√																		
						20	292(100), 264(86), 246(24), 244(21), 178(21), 166(38), 156(15), 143(43), 132(58), 127(25), 120(86), 97(29)																				
						30	264(11), 246(14), 144(23), 143(15), 132(85), 127(10), 120(100), 105(18), 103(20), 97(21), 91(30), 87(13), 85(10), 69(23)																				
						40	144(37), 143(13), 132(59), 120(100), 105(41), 103(48), 97(17), 91(41), 87(24), 85(12), 79(10), 69(21), 59(16)																				
				326	NI	10	248(48), 164(100)																				
						20	164(100), 152(42), 72(25)																				
						30	164(100), 103(51), 72(32)																				
						40	103(100), 91(81), 72(44)																				
				P6	0,72	288	-	289	PI	10	209 (100)																
										20	289(27), 209(100), 149(39)																
										30	289(31), 209(36), 182(28), 166(100), 149(99), 138(62)																
										40	194(100), 182(48), 166(90), 149(63), 138(19), 110(59), 78(54)																
287	NI	10	207 (100), 192 (29)																								
		20	207 (42), 192 (100)																								
		30	207(5), 192(100), 164(5), 108(11)																								
		40	192(100), 175(11), 164(26), 136(6), 120(9), 108(35)																								
P7	0,77	354	-	355	PI	-																					
				353	NI	10-30	191 (100)																				
P8	0,77	204	-	205	PI	10	188(99), 170(5), 159(10), 146(100), 144(17), 132(5), 118(6)																				
						20	188(6), 170(11), 159(9), 146(100), 144(31), 132(18), 118(78)																				
						30	146(11), 132(14), 118(100), 115 (27), 91(17)																				
						40	143(42), 132(10), 118(94), 115(100), 103(6), 91(98), 77(10)																				
P9a	0,80	354	327, 302sh, 242	355	PI	10	193 (5), 163 (100)	√	√																		
						20	193(5), 163(100), 145(8)																				
						30	193(8), 163(100), 145(42), 135(24), 117(10), 89(5)																				
						40	193(6), 163(75), 145(80), 135(100), 133(13), 117(100), 107(12), 89(58), 79(13)																				
P9b	1,05	354	327, 302sh, 242	353	NI	10	191 (100)																				
						20	191 (100)																				
						30	191 (100)																				
						40	191 (100)																				

Pik	tr	Mw	UV	Precursor Ion m/z	Mode	V _{col} (V)	Produkt jon m/z, relativni udeo	U. dio, - H	U. dio, - K	U. kio, - H	U. kio, - K	P. jud, - H	P. jud, - K	P. lus, - H	P. lus, - K	P. off, - H	P. off, - K															
P10	0,81	651	220, 290, sh325	652	PI	10	634(74), 616(94), 598(26), 568(100), 490(29)		√																							
							20											634(23), 616(23), 598(26), 568(100), 490(17)														
							30											598(14), 568(100), 552(10), 490(14), 445(38), 315(12)														
							40											568(31), 552(25), 445(100), 393(26), 315(38), 314(26), 240(41), 228(40), 198(42), 130(22), 120(55)														
				650	NI	10	650 (100), 560 (66)																									
							20											650 (30), 560 (66)														
							30											560 (100), 488 (10)														
							40											488(36), 486(95), 444(100), 429(25)														
				P11	0,89	296	327, sh300, 242											297	PI	10	219(100), 201(44), 173(5), 119(8)											
																					20											219(19), 201(82), 173(89), 119(100), 101(9)
																					30											201(7), 173(100), 129(20), 119(73), 101(48), 61(27)
																					40											173(44), 158(14), 129(49), 119(38), 101(100), 95(20), 86(5), 71(9), 61(38)
295	NI	10	207(94), 192(45), 179(24), 174(13), 163(24), 133(100), 115(15)																													
			20					207(8), 192(27), 174(16), 163(15), 135(100), 115(39), 71(7)																								
			30					163(11), 135(100), 115(30), 71(12)																								
			40					163(5), 135(100), 115(10), 71(8)																								
P12	0,94	290	280					291	PI	10	273(5), 165(22), 147(12), 139(100), 123(46)																					
											20																					207(6), 179(5), 165(7), 161(13), 147(26), 139(100), 123(49)
											30																					161(19), 147(33), 139(100), 123(86), 119(10), 111(8), 105(7), 55(5)
											40																					161(9), 147(21), 139(55), 123(100), 119(19), 115(12), 111(12), 105(12), 55(13)
				289	NI	10	289(98), 245(100), 205(38), 203(52), 188(17), 187(14), 179(27), 165(15), 161(21), 151(11), 137(10)																									
							20	289(27), 245(51), 221(24), 203(98), 188(32), 187(32), 175(56), 151(50), 125(100), 109(82), 97(24)																								
							30	203(25), 175(22), 164(22), 160(32), 159(27), 137(24), 125(36), 123(100), 121(21), 109(83)																								
							40	173(20), 123(62), 109(100), 97(16), 83(16), 57(24)																								
				P13	0,97	296	327, sh300, 242				Isto kao kod P11																					
				P14	1,06	422	250, 327 (prek)	423	PI	10	405(100), 387(76), 369(17), 339(79), 208(15)												√									
											20																					339(77), 244(38), 238(26), 208(100), 198(20), 132(26)
											30																					339(94), 244(83), 238(43), 208(100), 198(48), 176(24), 169(26), 162(46), 142(23), 132(25), 130(29), 97(30), 86(47), 84(21), 81(28)
40	244(25), 208(56), 198(63), 169(83), 162(37), 154(40), 142(100), 134(88), 130(44), 97(85), 84(69), 81(46), 69(36)																															
421	NI	10	359(64), 331(83), 301(55), 259(100), 200(57), 128(17), 84(69), 81(46), 69(36)																													
			20					331(20), 259(100), 241(57), 223(10), 200(23), 199(9), 130(20), 128(74), 84(52), 81(35), 69(27)																								
			30					241(36), 223(21), 200(20), 130(68), 128(100), 112(11), 84(69), 81(46), 69(36)																								
			40					197(36), 130(100), 128(71), 84(69), 81(46), 69(36)																								

Pik	tr	Mw	UV	Precursor Ion m/z	Mode	V _{col} (V)	Produkt jon m/z, relativni udeo	U. diio, - H	U. diio, - K	U. kio, - H	U. kio, - K	P. juu, - H	P. juu, - K	P. ius, - H	P. ius, - K	P. off, - H	P. off, - K	
P15	1,06	456	250, 327 (prek)			-		√										
P16	1,08	594		595	PI	10	577(100), 559(17), 559(25), 529(37), 523(15), 511(15), 499(22), 475(57), 457(89)				√							
						20	559(23), 541(29), 523(22), 511(31), 481(32), 457(100), 439(28), 427(35), 421(22), 409(58), 379(25)											
						30	463(29), 457(34), 439(36), 427(38), 421(50), 409(59), 403(27), 403(35), 391(43), 379(87), 349(29), 337(49), 325(100), 307(30), 295(42)											
						40	403(33), 391(38), 379(48), 337(46), 325(100), 307(28), 295(59)											
				593	NI	10	593(100), 575(35), 563(38), 472(25), 353(38), 341(19)											
						20	593(100)											
						30	593(100), 473(52), 383(32), 353(69)											
						40	473(26), 395(16), 383(66), 353(100), 325(22)											
P17	1,08	296	330, sh310, 245	319	PI	10	301(12), 241(14), 185(18), 163(100), 157(39)	√				√		√		√		
						20	319(10), 163(100), 157(11), 85(15)											
						30	185(6), 163(55), 145(12), 85(100)											
						40	145(5), 103(7), 85(100)											
				295	NI	10	179(31), 135(10), 133(100), 115(14)											
						20	179(13), 135(34), 133(100), 115(63), 71(14)											
						30	135(55), 133(55), 115(100), 71(43)											
						40	135(60), 133(23), 115(94), 89(10), 73(13), 71(100)											
P18	1,16	359	295, sh320	360	PI	10	163 (100)		√									
						20	163 (100), 145 (10)											
						30	163(100), 145(56), 135(31), 117(17)											
						40	163(60), 145(85), 135(99), 117(100), 107(16), 89(57)											
				358	NI	10	222(100), 178(52), 161(12), 135(17)											
						20	222(28), 178(100), 161(38), 135(46)											
						30	178(36), 161(36), 135(100)											
						40	161(29), 135(100), 133(24)											
P19	1,19	624	265, 340	625	PI	10	607(81), 589(44), 559(31), 541(20), 529(18), 505(37), 487(100)				√							
						20	607(23), 589(41), 571(20), 553(25), 529(24), 505(29), 487(100), 457(47), 439(24), 409(28)											
						30	487(26), 469(34), 457(66), 451(24), 439(37), 433(22), 421(28), 409(56), 379(24), 367(26), 355(100)											
						40	439(35), 433(27), 421(39), 409(53), 379(32), 367(45), 367(29), 355(100), 337(22), 325(46)											
				623	NI	10	623 (100)											
						20	623 (100), 503 (10)											
						30	623(100), 533(7), 503(41), 413(40), 383(67)											
						40	623(10), 503(13), 413(78), 383(100), 312(19)											

Pik	tr	Mw	UV	Precursor Ion m/z	Mode	V _{col} (V)	Produkt jon m/z, relativni udeo	U. dio, - H	U. dio, - K	U. kio, - H	U. kio, - K	P. jud, - H	P. jud, - K	P. lus, - H	P. lus, - K	P. off, - H	P. off, - K
P20	1,30	679	270, 360	680	PI	10	534 (33), 372 (100)					√					
						20	680 (45), 534 (19), 372 (100)										
						30	534(6), 372(100), 354(24), 85(7)										
						40	372(89), 355(100), 85(37), 71(22), 57(6)										
				678	NI	10	678 (100)										
						20	678 (100)										
						30	678 (100), 369 (22)										
						40	678(62), 550(12), 369(100), 353(20), 325(12), 248(14)										
P21	1,45	624					Isto kao P19										
P22	1,47	388		406	PI	-						√		√			
P23	1,52	354	preklopljen			-						√				√	
P24	1,52	448	-	449	PI	10	431(100), 413(46), 395(29), 383(66), 353(55), 329(74), 299(26)			√							
						20	431(5), 413(22), 395(30), 383(16), 353(56), 329(77), 299(100), 287(6)										
						30	395(9), 377(13), 365(15), 353(23), 339(22), 329(65), 325(24), 299(100), 287(6)										
						40	377(6), 365(9), 353(5), 339(17), 329(38), 325(33), 311(17), 299(100), 287(6), 283(13), 165(14), 137(7)										
				447	NI	10	47(46), 429(20), 357(80), 327(100)										
						20	447(57), 429(14), 357(98), 327(100), 297(5), 285(6)										
						30	357(85), 327(100), 311(7), 297(39), 285(25)										
						40	357(24), 339(23), 327(85), 311(31), 297(100), 285(49), 269(8), 255(8), 201(7), 199(7), 193(6), 191(6), 175(17), 163(8), 161(6), 133(14)										
P25	1,62	164	317, sh300, 230	165	PI	-		√									
				163	NI	10	163(17), 119(100)										
						20	119(100)										
						30	119(100), 93(43)										
						40	119(100), 117(32), 93(66)										
P26	1,69	576	335, plato 290	577	PI	10	333(35), 315(17), 227(100), 209(99), 189(36), 171(28)							√			
						20	227(33), 209(65), 171(100), 149(49), 109(36)										
						30	287(100), 227(9), 209(35), 191(35), 171(98), 109(19)										
						40	191(7), 171(15), 153(10), 147(27), 115(100), 97(56)										
				575	NI	10	557(6), 187(100), 125(10)										
						20	575(35), 187(100), 145(8), 125(49)										
						30	187(53), 145(13), 125(100), 99(6)										
						40	187(15), 145(10), 125(100), 99(10), 81(6)										

Pik	tr	Mw	UV	Precursor Ion m/z	Mode	V _{col} (V)	Produkt jon m/z, relativni udeo	U. dio, - H	U. dio, - K	U. kio, - H	U. kio, - K	P. jud, - H	P. jud, - K	P. lus, - H	P. lus, - K	P. off, - H	P. off, - K									
P27	1,77	596	280, 325-350	597	PI	10	451(44), 435(21), 433(19), 355(10), 331(17), 289(100), 129(14)			√																
						20	451(44), 435(21), 433(19), 355(10), 331(17), 289(100), 129(14)																			
						30	301(17), 289(100), 195(33), 153(38), 85(60), 71(72)																			
						40	381(15), 289(85), 195(96), 153(51), 85(69), 71(100)																			
				595	NI	10	595(100), 459(33), 151(8)																			
						20	595(100), 459(10), 151(5)																			
						30	595(74), 459(100), 339(12), 287(13), 235(15), 193(9), 151(53), 135(10)																			
						40	459(26), 339(10), 235(17), 193(9), 151(100), 135(27), 109(8)																			
				P28	1,80	554	571	PI	-	-	√															
									553	NI	-															
				P29	2,01	280	315, 230	303	PI	10	161 (100)															
										20	161 (100), 133 (11)															
30	161(98), 133(100), 118(7), 105(14)																									
40	161(29), 133(100), 118(29), 105(18), 103(22), 90(12), 79(28), 77(11)																									
279	NI	10	191(57), 176(100), 119(24)																							
		20	176(61), 119(100)																							
				30-40		119(100)																				
P30	2,03	432	340, 275	433	PI	10	415(100), 397(58), 379(37), 367(81), 337(84), 313(94), 283(37)			√																
						20	397(18), 379(29), 337(63), 313(76), 283(100), 271(7)																			
						30	337(21), 323(21), 313(63), 309(26), 283(100)																			
						40	323(17), 313(41), 283(100), 165(20)																			
				431	NI	10	431(31), 341(27), 311(100)																			
						20	431(42), 341(38), 311(100)																			
						30	341(26), 323(13), 311(100), 283(51)																			
						40	341(7), 323(10), 311(29), 283(100), 269(6), 161(5)																			
				P31	2,09	348	280, 225	349	PI	10	331(27), 313(49), 303(15), 295(40), 285(26), 267(28), 205(46), 188(100), 170(11), 159(17), 130(50)															
										20	285(6), 267(21), 249(7), 205(5), 188(100), 170(15), 159(42), 146(19), 130(48), 85(6)															
										30	249(10), 188(59), 170(27), 159(56), 146(100), 130(62), 118(12), 109(10), 99(14), 85(11)															
										40	188(12), 185(24), 170(30), 159(37), 146(100), 130(73), 118(46), 109(12), 99(11), 85(9)															
347	NI	10	347(7), 311(10), 285(12), 245(100), 203(42)																							
		20	245(33), 203(100), 116(10), 74(7)																							
		30	203(100), 159(13), 142(8), 116(25), 98(5), 74(19)																							
		40	203(63), 186(6), 159(22), 142(43), 116(100), 98(9), 74(75), 58(6)																							
P32	2,11	530								-			√													

Pik	tr	Mw	UV	Precursor Ion m/z	Mode	V _{col} (V)	Produkt jon m/z, relativni udeo	U. dio, - H	U. dio, - K	U. kio, - H	U. kio, - K	P. jud, - H	P. jud, - K	P. lus, - H	P. lus, - K	P. off, - H	P. off, - K					
P33	2,12	610	360, 300, 260	611	PI	10	465 (16), 303 (100)	√				√		√		√						
						20	303 (100), 85 (7)															
						30	303 (100), 85 (10), 71 (9)															
						40	303 (100), 85 (15), 71 (1)															
				609	NI	10	609(100), 301(14), 300(9)															
						20	609(100), 301(6)															
						30	609(100), 301(60), 300(80)															
						40	301(36), 300(100), 271(7)															
P34	2,14	532		533	PI	10	307(82), 271(27), 227(35), 209(46), 204(17), 163(78), 147(13), 145(100), 127(24), 85(25)	√		√												
						20	227(19), 191(10), 163(35), 147(18), 145(100), 127(54), 103(23), 85(33)															
						30	145(24), 127(100), 109(25), 103(50), 85(85)															
						40	133(18), 127(58), 103(100), 93(26), 85(70)															
				531	NI	10	531(12), 469(13), 429(100), 387(22), 143(33), 125(52), 101(15), 99(75), 59(14)															
						20	531(100), 429(16), 387(22), 207(23), 161(13), 143(11), 125(45), 101(16), 99(98), 59(39), 57(26)															
						30	207(34), 189(18), 163(12), 161(11), 125(24), 113(6), 101(16), 99(100), 71(6), 59(29), 57(40), 55(12)															
						40	207(47), 189(66), 163(27), 125(65), 123(20), 113(18), 101(25), 99(64), 71(15), 59(71), 57(100), 55(12)															
P35	2,18	464	320, sh350, 260	465	PI	10	303 (100)											√				
						20	303 (100)															
						30	303 (100), 85 (9)															
						40	303(100), 165(10), 153(10), 97(7), 85(14), 69(5)															
				463	NI	10	463(39), 301(100)															
						20	463(78), 301(100)															
						30	301(22), 300(100), 271(16), 255(7), 151(7)															
						40	301(7), 300(73), 271(100), 255(28), 243(8), 151(8)															
P36	2,20	462		463	PI	10	445(100), 427(54), 397(70), 367(66), 343(72), 313(30)			√												
						20	445(7), 427(31), 409(36), 397(20), 391(21), 367(77), 343(93), 313(100), 301(8)															
						30	409(9), 391(13), 379(15), 343(58), 339(20), 313(100), 301(6)															
						40	379(12), 353(16), 343(48), 328(28), 313(100), 301(5)															
				461	NI	10	461(72), 371(29), 341(100)															
						20	461(77), 371(39), 341(100), 298(8)															
						30	371(23), 341(100), 298(68)															
						40	341(9), 298(100), 297(10)															
P37	2,31	262		263	PI	10	245(31), 217(17), 188(100), 185(31), 158(11), 146(30), 132(12), 70(25)										√					
						20	263(10), 245(11), 203(27), 188(20), 185(33), 170(7), 146(85), 132(22), 118(7), 105(30), 70(100)															

Pik	tr	Mw	UV	Precursor Ion m/z	Mode	V _{col} (V)	Produkt jon m/z, relativni udeo	U. dio, - H	U. dio, - K	U. kio, - H	U. kio, - K	P. jud, - H	P. jud, - K	P. lus, - H	P. lus, - K	P. off, - H	P. off, - K	
						30	185(16), 170(10), 146(42), 118(100), 105(6), 70(57)											
						40	132(5), 118(100), 117(63), 115(67), 105(26), 91(23), 70(94)											
					NI	-												
P38	2,34	524	280, 220	563	PI	-			√									
				523	NI	10	523 (10), 361 (100)											
						20	523 (100), 361 (26)											
						30	523(14), 361(100), 346(6), 343(13)											
						40	523(7), 361(100), 346(13), 343(10), 223(12), 165(53), 89(17)											
P39	2,44	606		607	PI	10	427(32), 309(12), 299(12), 165(7), 147(100)					√					√	
						20-40	147 (100)											
				605	NI	10	605 (23), 441 (100)											
						20	605(39), 441(100), 163(12)											
						30	441(100), 265(20), 205(21), 163(32), 145(52)											
						40	441(7), 265(14), 205(23), 163(44), 145(100), 119(17)											
P40	2,44	404	270	427	PI	-		√										
				403	NI	10	403(80), 223(100), 179(52)											
						20	283(19), 223(100), 179(78), 119(20), 89(12), 59(40)											
						30	89 (47), 59 (100)											
						40	59 (100)											
P41	2,49	310		333	PI	10-40	-											√
				309	NI	10	206(9), 193(7), 177(70), 133(13), 131(21), 103(59), 87(8), 59(100)											
						20	177(45), 133(21), 87(18), 59(100)											
						30	133(17), 118(12), 87(25), 59(100)											
						40	118(19), 117(16), 59(100)											
P42	2,51	532	280	281	PI	10	497(8), 307(37), 227(23), 145(100), 127(43)			√								
						20	227(6), 145(100), 127(73), 103(11), 85(18)											
						30	145(52), 127(53), 103(100), 85(32)											
						40	127(87), 103(100), 85(92)											
				279	NI	10	487(22), 429(24), 387(7), 125(100), 99(47)											
						20	531(20), 387(25), 125(39), 99(100), 59(59)											
						30	189(6), 125(51), 113(39), 101(50), 99(79), 71(47), 59(43), 57(100)											
						40	189(4), 113(5), 101(62), 99(56), 59(50), 57(100)											
P43	2,55	582	230	583	PI	10-40	100 (100)					√			√		√	
				581	NI	10	581 (100)											

Pik	tr	Mw	UV	Precursor Ion m/z	Mode	V _{col} (V)	Produkt jon m/z, relativni udeo	U. dio, - H	U. dio, - K	U. kio, - H	U. kio, - K	P. jud, - H	P. jud, - K	P. lus, - H	P. lus, - K	P. off, - H	P. off, - K		
- ['481'·Val]-							20	581 (100)											
							30	581(100), 437(16), 410(38), 180(74)											
							40	410(9), 282(95), 256(23), 237(15), 191(100), 180(8), 167(13), 111(18)											
P44	2,67	458	-	476	NI	10	295(59), 277(24), 261(29), 259(61), 241(25), 223(24), 165(65), 163(100), 145(99), 133(92), 127(65), 115(52), 97(40), 85(34)			√									
							20	165(87), 145(78), 133(65), 127(42), 115(63), 97(69), 85(100), 73(92)											
							30	165(42), 145(20), 137(32), 115(46), 97(72), 85(96), 73(100), 69(32), 61(29), 57(31)											
							40	137(22), 97(40), 85(54), 73(100), 69(24), 61(25), 57(27)											
							503	PI	10	293(100), 149(27)									
							20	293(72), 191(5), 149(43), 143(22), 131(14), 101(8), 89(100)											
							30	149(25), 125(23), 112(16), 89(70), 71(10), 59(100)											
							40	89 (52), 59 (100)											
P45	2,69	450	-	473	PI	10	455(40), 413(26), 411(20), 311(100), 293(54), 238(18), 203(7)			√				√		√			
							20	473(100), 311(32)											
							30	473(26), 311(100), 293(16), 249(26), 203(18)											
							40	311(100), 251(6), 191(7), 169(6), 161(16)											
							449	NI	10	269(100), 225(9), 187(17)									
							20	449(58), 269(100), 251(9), 225(12), 209(21)											
							30	269(100), 251(11), 225(28), 207(38), 189(13), 165(20), 99(12), 89(16), 71(11), 59(58)											
							40	250(7), 209(90), 165(14), 125(32), 99(25), 71(20), 59(100)											
P46	2,69	530	preklopljen	553	PI	-	-			√									
							529	NI	-										
P47	2,70	622	280, 230		PI	10	483 (100)		√										
							20	645 (100)											
- 9,9'-bisacetil-neoolivil-4-O-Glc							30	645 (100), 483 (9)											
							40	645(100), 483(53), 309(11), 299(16), 157(19)											
							NI	10	621 (11), 459 (100)										
							20	459 (100), 399 (8), 339 (6)											
							30	459(100), 399(17), 339(52), 309(7), 263(5), 203(27), 151(23)											
							40	459(22), 399(10), 339(100), 324(21), 309(8), 283(8), 263(19), 203(75), 188(16), 188(25), 164(10), 151(51), 59(10)											
P48	2,71	594	-	595	PI	10	449 (21), 287 (100)	√				√				√			
							20	287 (100), 85 (6)											
- kemferol/luteolin-3-O-rutinozid							30	287 (100), 85 (16), 70 (12)											
							40	287 (100), 85 (20), 73 (6), 71 (18)											

Pik	tr	Mw	UV	Precursor Ion m/z	Mode	V _{col} (V)	Produkt jon m/z, relativni udeo	U. dio, - H	U. dio, - K	U. kio, - H	U. kio, - K	P. jud, - H	P. jud, - K	P. lus, - H	P. lus, - K	P. off, - H	P. off, - K
				593	NI	10	593 (35), 285 (100)										
						20	593 (100), 285 (8)										
						30	593(44), 285(100), 284(26)										
						40	285 (100), 284 (88), 229 (9)										
P49	2,78	262	280	263	PI	10	295(18), 259(16), 241(14), 165(72), 133(100), 115(60), 85(5)				√						
						20	476(10), 165(34), 133(82), 115(100), 97(90), 85(61), 73(12), 69(24)										
						30	165(55), 137(89), 133(47), 115(62), 97(100), 87(87), 85(37), 73(63), 69(74), 57(12)										
						40	137(36), 133(11), 115(8), 97(69), 85(68), 69(100), 57(80)										
				261	NI	10	457 (14), 293 (100)										
						20	293 (24), 233 (100), 89 (13)										
						30	125 (62), 89 (100), 59 (7)										
						40	89 (52), 59 (100)										
P50	2,78	534	250, 275, 350	535	PI	10	449 (21), 287 (100)				√						
						20-40	287 (100)										
P51	2,78	548					-				√						
P52	2,84	536	280	537	PI	10-40	100 (100)										
				535	NI	10	535(8), 435(13), 429(6), 408(100), 297(23)										
						20	535(100), 435(14), 429(9), 329(7), 297(15)										
						30	429(49), 392(14), 329(47), 302(35), 297(99), 286(96), 280(50), 191(100), 167(42), 134(11)										
						40	302(14), 286(81), 250(23), 191(100), 167(13), 134(28)										
							- [297-His-Val]										
P53	2,87	478	nema	479	PI	10	317 (100)		√								
						20	317 (100), 85 (6)										
						30	317 (100), 302 (6), 85 (3)										
						40	317 (100)										
				477	NI	10	477 (100)										
						20	477 (100), 314 (17)										
						30	477(30), 315(19), 314(100), 286(7), 285(11), 271(13), 243(10)										
						40	315(15), 314(44), 300(15), 299(29), 285(50), 271(81), 270(19), 257(31), 243(100), 242(22)										
P54	2,88	608	260, 275, 350	609	PI	10-30	301 (100)				√						
						40	301 (100), 286 (8)										
				607	NI	10	607 (100), 299 (90)										
						20	607 (100), 299 (38)										
						30	607(39), 299(100), 284(9)										
						40	299(100), 284(9)										

Pik	tr	Mw	UV	Precursor Ion m/z	Mode	V _{col} (V)	Produkt jon m/z, relativni udeo	U. dio, - H	U. dio, - K	U. kio, - H	U. kio, - K	P. jud, - H	P. jud, - K	P. lus, - H	P. lus, - K	P. off, - H	P. off, - K		
P55	2,89	624	260, sh270, 350	625	PI	10	589 (17), 147 (100)					√		√		√			
							20	625(42), 317(100), 147(63)											
							30	317(100), 148(28), 126(23)											
							40	317(100), 302(24), 148(63), 146(37), 136(25)											
							623	NI	10-20	Nema									
						30-40	315 (100)												
P56	2,96	296	preklopljen	314	PI	10	236(46), 145(6), 101(100), 97(23)					√							
							20	314(23), 153(28), 146(26), 127(41), 101(100), 97(33), 85(38), 79(18)											
							30	173(7), 101(30), 99(22), 85(100), 69(15), 57(11)											
							40	101(28), 85(100), 83(49), 69(25), 55(19)											
							341	NI	10-40	-									
P57	2,97	568	330	569	PI	10	524(11), 505(100), 477(30), 434(19), 84(46)							√		√			
							20	569(27), 505(55), 477(19), 434(6), 224(7), 84(100)											
							30	224(6), 84(100)											
							40	84(100)											
							567	NI	10	503(56), 485(41), 419(100), 392(13), 247(15)									
						20	567(100), 503(31), 419(96), 392(17), 247(26), 133(6)												
						30	503(5), 419(100), 273(24), 257(38), 247(61), 187(42), 160(12), 134(9)												
						40	273(39), 257(20), 247(75), 187(100), 171(22), 160(40), 134(69)												
P58	3,12	188	-	211	PI	10-40	-	√	√	√	√								
P59	3,13	326	280	349	PI	10	308(23), 270(100), 185(6)					√				√			
							20	349(100), 308(11), 211(15), 136(4)											
							30	289(71), 211(100), 209(83), 181(59), 147(46), 136(29), 71(40)											
							40	211(98), 121(100), 105(41), 69(15)											
							371	NI	10-40	-									
P60	3,18	526	-	527	PI	10-40	-										√		
							525	NI	10-40	-									
P61	3,18	524	-	525	PI	10-40	138 (100)					√					√		
							523	NI	10	385 (100)									
						20	523(100), 385(34), 358(28), 342(7), 247(7)												
- [247•His•His]																			

Pik	tr	Mw	UV	Precursor Ion m/z	Mode	V _{col} (V)	Produkt jon m/z, relativni udeo	U. dio, - H	U. dio, - K	U. kio, - H	U. kio, - K	P. jud, - H	P. jud, - K	P. lus, - H	P. lus, - K	P. off, - H	P. off, - K	
						30	523(5), 385(8), 358(30), 342(100), 247(31), 223(46)											
						40	342(100), 247(85), 223(59), 134(14)											
P62	3,21	464	-	487	PI	10-40	-				√							
				463	NI	10	417(100), 195(39)											
						20	463(56), 195(100), 59(8)											
						30	195(100), 180(93), 161(31)											
						40	180 (100), 59 (19)											
P63	3,25	558	-	559	PI	10	514(16), 366(8), 349(14), 138(100)											√
						20	559(27), 349(6), 138(100)											
						30-40	138 (100)											
				557	NI	10	419(100)											
						20	557(82), 494(7), 419(100), 392(52), 376(21), 281(18), 264(9), 257(15), 153(5)											
						30	419(35), 392(60), 376(82), 281(75), 264(100), 257(14), 153(7)											
						40	392(5), 376(32), 281(18), 264(100), 134(8), 111(10)											
P64	3,30	534	260, 300	535	PI	10	507(9), 471(100), 443(19), 84(69)					√						
						20	535(29), 471(41), 443(21), 102 (7), 84(100)											
						30	102(7), 84(100)											
						40	102(7), 84(100)											
				533	NI	10	469(78), 468(100), 385(76), 358(36)											
						20	533(100), 469(10), 385(56), 358(46), 341(7), 247(12)											
						30	385(54), 342(42), 247(100), 133(35)											
						40	342(37), 247(100), 133(14)											
P65	3,32	516	300	539	PI	10	347 (100)	√		√								
						20	539(79), 521(19), 347(100)											
						30	539(10), 347(100), 345(6)											
						40	347(100), 329(19), 287(46), 285(31), 133(19), 119(24)											
				515	NI	10	453(16), 413(76), 371(28), 179(10), 143(34), 125(40), 101(19), 99(100), 59(27)											
						20	515(58), 371(27), 179(14), 161(14), 125(67), 99(100), 59(52), 57(43)											
						30	161(17), 125(43), 113(25), 101(34), 99(100), 89(34), 59(63), 57(80)											
						40	125(28), 113(22), 99(43), 89(10), 71(13), 59(73), 57(100), 55(36)											
P66	3,34	430	320	448	PI	10-40	-											√
				429	NI	10-40	-											
P67	3,37	516	320	539	PI	10-20	347 (100)	√		√								
						30	347(100), 285(24), 175(5)											

Pik	tr	Mw	UV	Precursor Ion m/z	Mode	V _{col} (V)	Produkt jon m/z, relativni udeo	U. dio, - H	U. dio, - K	U. kio, - H	U. kio, - K	P. jud, - H	P. jud, - K	P. lus, - H	P. lus, - K	P. off, - H	P. off, - K
				515	NI	40	347(100), 287(68), 285(61), 164(16)										
						10	413(26), 161(11), 125(57), 101(13), 99(100), 59(22)										
						20	515(75), 125(81), 119(18), 101(44), 99(100), 59(26), 57(27)										
						30	125(35), 113(17), 101(53), 99(84), 89(25), 59(100), 57(42)										
						40	101(40), 99(64), 89(46), 71(24), 57(100), 55(20)										
P68	3,42	554	-	555	PI	10-40	100 (100)					√		√			√
				553	NI	10	553(23), 535(13), 426(55), 281(100), 279(16), 264(21), 171(6)										
						20	553(100), 453(37), 426(16), 281(78), 262(10)										
						30	453(13), 291(30), 288(18), 281(100), 264(29), 200(17), 189(17), 134(12)										
						40	281(62), 270(14), 264(55), 261(35), 200(33), 189(100), 173(29), 172(16), 160(24), 146(22), 134(66)										
P69	3,44	430	320 (zanemarljiv)	453	PI	-	-	√									
				429	NI	10	249(100), 205(39), 179(5), 161(8), 119(7), 89(8)										
						20	429(38), 249(99), 205(100), 187(10), 161(14), 113(14), 89(22), 59(5)										
						30	249(100), 205(36), 161(56), 119(18), 89(9), 59(91)										
						40	59 (100)										
P70	3,49	178	220, 240, sh300 320	179	PI	10	147(17), 135(7), 101(100)		√								
						20	147(48), 119(79), 101(58), 91(100), 79(26), 57(10)										
						30	119(37), 101(13), 91(100), 73(15), 65(80), 62(29), 61(20)										
						40	91(57), 65(100), 57(9)										
				177	NI	10	177(100), 145 (30), 118(20), 117(11)										
						20	145(57), 118(36), 117(100)										
						30-40	117 (100)										
P71	3,52	516	300				Isto kao P65 i P67			√							
P72	3,58	534	-				-							√			
P73	3,59	200	-	223	PI	10-40	-										√
				199	NI	10-40	-										
P74	3,63	520	-	521	PI	10-40	100 (100)						√				
				519	NI	10	519(100), 419(8), 392(6), 281(8)										
						20	519(100), 419(31), 392(19), 376(8), 281(45), 264(21)										
						30	419(18), 392(14), 376(33), 281(99), 264(100), 189(14), 160(5), 143(10), 134(9)										
						40	376(15), 281(58), 264(100), 189(39), 160(14), 143(15), 134(32), 111(14)										
P75	3,66	552	-	553	PI	10	132 (100)							√			
						20	553 (5), 132 (100), 84 (7)										
						30	132 (100), 84 (35)										

Pik	tr	Mw	UV	Precursor Ion m/z	Mode	V _{col} (V)	Produkt jon m/z, relativni udeo	U. dio, - H	U. dio, - K	U. kio, - H	U. kio, - K	P. jud, - H	P. jud, - K	P. lus, - H	P. lus, - K	P. off, - H	P. off, - K	
				551	NI	40 10 20 30 40	132(100), 84(100), 61(7) 419 (100) 551(100), 419(65), 247(8), 187(5) 551(10), 419(100), 257(12), 247(34), 187(59) 247(10), 187(69), 134(100)											
P76	3,75	394	-	395	PI	10 20 30 40	317 (100), 239 (11) 239(100), 195(82) 239(26), 195(100) 195(100), 109(8), 95(33), 81(13)					√						
				393	NI	10-20 30 40	393 (100) 393 (100), 97 (26) 241(20), 177(45), 97(100)											
P77	3,75	514	-	515	PI	10 20 30 40	209(100), 191(89), 145(10), 133(25) 209(40), 191(100), 137(24), 133(36), 127(22) 209(25), 191(63), 173(21), 151(53), 149(30), 137(51), 133(100), 127(34), 109(16), 107(20), 103(20) 191(60), 151(100), 137(65), 135(41), 133(86), 127(27), 121(46), 109(49), 107(41), 103(24), 99(22), 69(20)			√								
				513	NI	10 20 30 40	469(100), 451(23), 323(29), 221(39), 161(70), 143(37), 125(29), 101(39), 99(36) 513(34), 125(39), 113(40), 101(53), 99(100), 73(20), 59(30), 57(41) 125(24), 123(27), 101(100), 99(66), 89(16), 59(21), 57(40) 125(27), 101(16), 99(22), 73(22), 71(12), 59(78), 57(100)											
P78	3,77	582		583	PI	10-40	-											
P79	3,84	568	-	569	PI	10-40	114 (100)							√				
				567	NI	10 20 30 40	567(65), 549(21), 453(100), 426(9), 281(56), 279(17) 567(89), 549(5), 453(70), 426(32), 281(100), 187(11) 567(29), 453(29), 281(100), 264(48), 187(80), 157(26), 134(16) 281(36), 264(81), 187(100), 160(32), 157(10), 134(6)											
							- [281•172•Leu]											
P80	3,84	500	-	501	PI	10-40	114 (100)											√
				499	NI	10 20 30 40	499(34), 385(100), 358(22), 247(20) 499(100), 385(84), 358(26), 342(18), 247(28) 499(14), 385(38), 358(17), 342(98), 247(100), 223(13), 134(20) 342(49), 247(100), 223(15), 181(20), 134(48), 133(24)											
							- [247•His•Leu]											
P81	3,89	520	280, 330 slabi	521	PI	10-40	100 (100)					√		√		√		
				519	NI	10	420(69), 392(100), 79(62)											

Pik	tr	Mw	UV	Precursor Ion m/z	Mode	V _{col} (V)	Produkt jon m/z, relativni udeo	U. dio, - H	U. dio, - K	U. kio, - H	U. kio, - K	P. jud, - H	P. jud, - K	P. lus, - H	P. lus, - K	P. off, - H	P. off, - K	
- [281-His-Val]							20 519(77), 419(36), 281(100)											
							30 281(80), 264(100)											
							40 -											
P82	3,91	500	-	501	PI	10-40	114 (100)							√		√		
							499 NI 10 500(25), 499(19), 385(100), 358(57), 342(6), 247(28)											
- [247-His-Leu]							20 499(100), 385(43), 358(13), 342(13), 247(35)											
							30 499(5), 385(8), 358(20), 342(99), 247(100), 157(14), 134(14)											
							40 342(68), 320(20), 247(100), 247(96), 230(20), 229(23), 225(15), 192(19), 181(39), 164(18), 159(18), 134(58), 111(16)											
P83	3,91	460	235, 280	478	PI	10	383 (48), 323 (100)		√									
							20 323 (100), 291 (17)											
- 9,9'-bisacetil-neoolivil							30 323(100), 308(19), 293(9), 292(10), 291(73), 276(9), 263(22), 259(10), 231(13)											
							40 323(43), 308(27), 293(78), 292(29), 291(100), 277(21), 276(68), 265(19), 263(79), 248(88), 231(98), 203(47), 157(24), 151(28)											
							459 NI 10 399(18), 339(100), 283(29), 263(15), 203(69), 177(23), 151(68), 59(6)											
							20 339(37), 327(23), 324(11), 263(14), 203(100), 188(47), 164(13), 151(58), 136(17), 59(18)											
							30 324(4), 203(13), 188(100), 164(12), 149(11), 136(63), 59(23)											
							40 203(52), 188(100), 174(10), 164(11), 135(24), 59(72)											
P84	3,91	486	-	487	PI	10	459(28), 388(100), 374(10), 352(45), 239(18), 145(7), 100(58), 86(6)										√	
							20 388(29), 239(11), 202(5), 100(100), 86(16)											
							30 100(100), 86(15)											
							40 100(100), 86(15), 58(11)											
							485 NI 10 485(7), 385(31), 358(17), 247(100)											
							20 485(100), 385(15), 247(57), 134(13)											
							30 385(8), 342(18), 247(100), 134(31)											
							40 247(100), 134(87)											
P85	3,99	568	-	569	PI	10-40	148 (100)							√		√	√	
							567 NI 10 549(30), 453(42), 419(70), 392(100), 281(47), 173(56), 89(35)											
- [281-His-Phe]							20 567(100), 550(9), 453(22), 419(58), 392(32), 281(12), 247(34), 189(15), 89(11)											
							30 419(58), 279(18), 257(15), 247(63), 192(16), 187(100), 171(11), 146(11)											
							40 284(18), 279(15), 272(39), 264(17), 257(44), 247(100), 221(23), 200(43), 189(27), 160(16), 134(72), 96(15)											
P86	4,01	548	-	549	PI	10	521(100), 490(57), 173(15), 120(18), 60(12)									√		
							20 549(100), 521(47), 173(6)											
							30 549(29), 521(100), 434(13), 173(83), 134(25), 120(55), 114(15), 60(59)											

Pik	tr	Mw	UV	Precursor Ion m/z	Mode	V _{col} (V)	Produkt jon m/z, relativni udeo	U. dio, - H	U. dio, - K	U. kio, - H	U. kio, - K	P. jud, - H	P. jud, - K	P. lus, - H	P. lus, - K	P. off, - H	P. off, - K
						40	202(26), 173(52), 134(29), 120(100), 60(91)										
				547	NI	10-40	-										
P87	4,07	500	-	501	PI	10-20	114 (100)							√		√	
						30	114 (100), 72 (7)										
						40	341 (6), 114 (100), 72 (7), 58 (6)										
				499	NI	10	499(76), 385(51), 320(30), 187(41), 125(100)										
						20	499(100), 385(21), 247(27), 167(13)										
						30	342(7), 247(12), 188(100), 153(75), 134(18)										
						40	342(44), 247(79), 167(17), 134(100)										
P88	4,14	548	280, 320	549	PI	10-40	-							√		√	
				547	NI	10-40	-										
P89	4,14	568	-	569	PI	10-40	148 (100)							√			
				567	NI	10	419 (100)										
						20	567(100), 419(17), 247(53)										
						30	-										
						40	327(13), 247(100)										
P90	4,15	534	280	535	PI	10-40	114 (100)						√				
				533	NI	10	533(19), 419(100), 392(32), 281(32), 264(15)										
						20	533(100), 419(66), 392(16), 376(12), 281(39), 264(15)										
						30	533(15), 419(47), 392(12), 376(98), 281(99), 264(100), 189(13), 134(10)										
						40	376(33), 281(36), 264(100), 189(37), 134(28), 111(21)										
P91	4,20	202	-	225	PI	10	145 (100)				√						
						20	167(48), 147(59), 103(100), 81(23), 79(12)										
						30	103(100), 88(10), 77(19)										
						40	103(100), 88(61), 79(33), 77(47), 55(23)										
				201	NI	10	201(24), 183(100), 139(94)										
						20	183(55), 139(100), 111(31), 57(22)										
						30-40	-										
P92	4,21	430	240, 320	453	PI	10	409(90), 291(100)							√			
						20	453(100), 291(57), 203(47), 185(17)										
						30	291(73), 203(100)										
						40	-										
				429	NI	10	249(100), 205(99), 161(8), 89(24)										
						20	429(18), 249(91), 205(100), 187(10), 161(31), 101(12), 89(23), 59(11)										

Pik	tr	Mw	UV	Precursor Ion m/z	Mode	V _{col} (V)	Produkt jon m/z, relativni udeo	U. dio, - H	U. dio, - K	U. kio, - H	U. kio, - K	P. jud, - H	P. jud, - K	P. lus, - H	P. lus, - K	P. off, - H	P. off, - K
						30	205(82), 187(23), 161(11), 101(8), 89(43), 71(24), 59(100)										
						40	187(43), 111(94), 101(32), 89(22), 71(30), 59(100)										
P93	4,27	548	280, 320	549	PI	10-40	-							√		√	
			Isto kao P88	547	NI	10-40	-										
P94	4,32	418	-	441	PI	10	263(100), 244(35), 201(57), 133(27), 115(34), 85(20)			√							
						20	441(100), 263(19), 261(7), 203(9), 201(26)										
			- neoolivil-acetat			30	441(21), 263(14), 261(7), 203(100), 201(57), 115(3), 69(7)										
						40	203(100), 97(82), 70(68), 69(100)										
				463	NI	-											
P95	4,33	534	-	535	PI	10-40	114 (100)					√		√			
				533	NI	10	-										
			- [281•His•Leu]			20	533(100), 419(43), 281(11), 264(18)										
						30	281 (100)										
						40	264(100), 189(17)										
P96	4,37	582	-	583	PI	10-40	-										√
				581	NI	10-40	-										
P97	4,45	384	245, 295	407	PI	10	277 (100)				√						
						20	407 (18), 277 (100), 131 (41)										
						30	131 (100)										
						40	131 (100), 102(37)										
				383	NI	10	217(9), 189(19), 163(55), 147(100), 121(94), 113(94), 103(7)										
						20	189(8), 163(56), 147(87), 121(100), 113(49), 103(29), 77(20)										
						30	163(38), 147(100), 121(90), 103(62), 77(54)										
						40	163(44), 147(24), 133(12), 121(89), 103(87), 77(100)										
P98	4,49	446	-	464	PI	10-40	-								√		√
				491	NI	10-40	-										
P99	4,77	550	-	551	PI	10-40	-					√		√			√
				549	NI	10-40	-										
P100	4,83	534	280	535	PI	10-40	148 (100)					√		√			
				533	NI	10	533(19), 385(100), 342(11), 247(15)										
			- [247•His•Phe]			20	533(100), 385(80), 358(23), 342(18), 247(24)										
						30	533(6), 385(40), 358(35), 342(100), 247(87), 223(17), 153(13), 134(14)										
						40	342(65), 247(100), 223(16), 134(44)										

Pik	tr	Mw	UV	Precursor Ion m/z	Mode	V _{col} (V)	Produkt jon m/z, relativni udeo	U. dno, - H	U. dno, - K	U. klo, - H	U. klo, - K	P. jud, - H	P. jud, - K	P. lus, - H	P. lus, - K	P. off, - H	P. off, - K				
P101	4,86	448	320	449	PI	10	236 (100)				√										
							20	449(100), 236(49)													
							30-40	-													
							447	NI	10	447 (100)											
										20	447 (100), 315 (33)										
						30	447 (37), 315 (100), 101 (100)														
						40	101(70), 85(100), 71(42)														
P102	4,91	568	-	569	PI	10-40	148 (100)						√		√		√				
							567	NI	10	419(100), 392(50)											
										20	567(100), 419(83), 392(32), 376(12), 302(6), 281(21), 264(20)										
										30	567(13), 419(55), 392(49), 376(100), 302(6), 281(54), 264(89), 146(5), 111(12)										
										40	376(26), 281(31), 264(100), 209(15), 189(14), 158(11), 146(16), 134(18), 111(30)										
- [281•His•Phe]																					
P103	4,96	534	-	535	PI	10-40	148 (100)					√									
							533	NI	10	385 (100), 358 (34)											
										20	533(53), 385(100), 358(21), 247(10)										
										30	385(8), 358(56), 342(23), 247(100)										
										40	342(100), 134(56)										
- [247•His•Phe]																					
P104	5,11	424	-	442	PI	10-40	-									√					
							423	NI	10-40	-											
P105	5,18	216	-	239	PI	10-40	-				√										
							215	NI	10	215 (13), 197 (100), 153 (29)											
										20	215 (7), 197 (100), 153 (51), 151 (5)										
30-40	-																				
P106	5,20	424	-	442	PI	10-40	-									√					
							423	NI	10-40	-											
P107	5,30	562	-	585	PI	-	-			√											
							561	NI	-	-											
P108	5,44	400	-	423	PI	10	203(100), 201(45)				√										
							20	423(100), 203(77), 201(23)													
							30	203(100), 201(7)													
							40	-													
							445	NI	10-40	-											
P109	5,51	228	-	229	PI	10	165(31), 147(100), 137(6), 123(17), 121(19), 105(20), 91(5), 81(42), 67(5)	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√				
							20	147(22), 137(6), 123(63), 121(52), 119(58), 105(57), 91(22), 81(100), 67(15), 55(16)													

Pik	tr	Mw	UV	Precursor Ion m/z	Mode	V _{col} (V)	Produkt jon m/z, relativni udeo	U. dio, - H	U. dio, - K	U. kio, - H	U. kio, - K	P. jud, - H	P. jud, - K	P. lus, - H	P. lus, - K	P. off, - H	P. off, - K	
						30	121(11), 105(98), 93(27), 81(100), 67(49), 55(30)											
						40	119(66), 105(36), 91(89), 81(91), 79(67), 77(53), 67(58), 55(100)											
				227	NI	10	183 (100), 165 (18)											
						20	183 (100)											
						30-40	-											
P110	5,51	250	-	251	PI	-		√										
				249	NI	10-40	-											
P111	5,58	228	-				Isto kao P109					√					√	
P112	5,58	328	-	351	PI	10	275(42), 195(21), 155(100), 109(8)	√						√				
						20	275(15), 155(73), 149(28), 135(34), 125(18), 109(100), 97(20), 81(16), 67(39)											
						30	155(9), 133(22), 119(32), 109(65), 97(46), 81(34), 67(100), 55(39)											
						40	133(16), 109(52), 93(11), 79(57), 67(100), 55(71)											
				327	NI	10	327 (100)											
						20	327(43), 229(34), 211(34), 171(100)											
						30	211(15), 171(100)											
						40	171(100)											
P113	5,63	342	240, sh260, 325	343	PI	10-40	-				√							
					NI	10-40	-											
P114	5,66	328	-	346	PI	10	293(23), 275(89), 195(42), 155(100), 149(13), 135(5), 109(8)	√	√	√				√			√	
						20	275(28), 247(16), 177(19), 155(100), 149(41), 135(44), 125(47), 119(15), 109(86), 97(35), 81(56), 67(39), 55(27)											
						30	149(19), 133(19), 119(22), 109(89), 91(44), 81(100), 67(98), 55(65)											
						40	133(17), 109(51), 107(48), 105(32), 91(30), 81(89), 67(85), 55(100)											
				327	NI	10	327(100), 229(6), 211(6)											
						20	327(78), 291(13), 221(16), 211(100), 183(9), 171(67), 85(6)											
						30	229(8), 211(89), 183(9), 171(100), 97(14), 85(24)											
						40	211(47), 171(100), 97(9), 69(24)											
P115	5,68	228	-	229	PI	10	165(22), 147(100), 105(7), 81(20)					√						
						20	151(100), 147(97), 81(42), 67(29)											
						30	81(100), 55(16)											
						40	105(43), 79(100), 71(48), 67(69)											
				227	NI	10	183 (100), 165 (22)											
						20	183 (100)											
						30-40	-											

Pik	tr	Mw	UV	Precursor Ion m/z	Mode	V _{col} (V)	Produkt jon m/z, relativni udeo	U. dno, - H	U. dno, - K	U. kio, - H	U. kio, - K	P. jud, - H	P. jud, - K	P. lus, - H	P. lus, - K	P. off, - H	P. off, - K		
P116	5,68	404	preklopljen	427	PI	10-40	-		√										
				449	NI	10-40	-												
P117	5,72	328	-				Isto kao P114							√		√			
P118	5,80	730	280, 320	753	PI	10-40	-												
				729	NI	10	369(28), 163(100), 145(18)												
						20	729(100), 681(14), 369(6), 163(64)												
						30	681(18), 369(40), 195(14), 165(21), 163(100), 145(10), 119(11)												
P119	5,84	328	-	346	PI	10	257(14), 155(100)	√		√									
						20	155(19), 109(100)												
						30	109(74), 67(100)												
						40	67 (100)												
- [komponente Mr=310-330]				327	NI	10	327(9), 309(24), 291(9), 201(36), 171(100), 137(13)												
						20	201(20), 171(100), 137(14)												
						30	199(6), 171(100), 137(13), 119(8)												
						40	201(6), 171(100), 81(22), 55(18)												
P120	6,13	330	240, 320	353	PI	10	295(23), 277(35), 195(28), 173(12), 155(100)	√	√	√	√		√	√	√	√	√		
						20	155(100), 151(16), 149(29), 137(16), 125(26), 109(51), 83(17), 81(31), 67(27)												
						30	109(100), 97(18), 95(17), 93(19), 83(24), 81(33), 71(16), 69(15), 67(80), 55(33)												
						40	109(62), 107(15), 95(35), 93(17), 91(21), 83(25), 81(55), 67(100), 57(20), 55(82)												
- [komponente Mr=310-330]				329	NI	10	329(100), 229(44), 211(46), 171(52), 139(21), 99(7)												
						20	329(100), 229(19), 211(35), 171(56), 139(10)												
						30	229(10), 211(48), 171(100), 139(37), 127(6), 99(8)												
						40	211(12), 171(100), 139(22), 127(8), 97(5)												
P121	6,15	228	-									√							
P122	6,22	328	-	351	PI	10-40	-	√		√									
				327	NI	10	327(63), 201(7), 171(100), 85(11)												
- [komponente Mr=310-330]						20	327(65), 327(57), 229(11), 211(28), 201(22), 183(17), 171(100), 85(6)												
						30	327(11), 229(20), 211(14), 183(10), 171(100), 119(8)												
						40	171(100)												
P123	6,24	330	240, 320	353	PI	10	295(17), 277(25), 173(12), 155(100)				√								
						20	277(20), 155(100), 137(18), 125(15), 109(63), 97(16), 67(20)												
						30	155(21), 109(100), 97(22), 95(20), 81(24), 67(74), 55(40)												
						40	109(22), 95(16), 91(16), 81(32), 67(100), 57(21), 55(52)												

Pik	tr	Mw	UV	Precursor Ion m/z	Mode	V _{col} (V)	Produkt jon m/z, relativni udeo	U. dio, - H	U. dio, - K	U. kio, - H	U. kio, - K	P. jud, - H	P. jud, - K	P. lus, - H	P. lus, - K	P. off, - H	P. off, - K
				329	NI	10	329(100), 229(13), 211(15), 171(69), 139(9)										
						20	329(100), 293(6), 229(12), 211(15), 171(82), 139(14)										
						30	293(7), 211(16), 171(100), 139(32), 127(13)										
						40	211(18), 171(100), 139(48), 127(26)										
P124	6,29	402	-	425	PI	10-40	203(100)					√					
				447	NI	10	401 (100), 161 (11)										
						20	447 (100), 401 (73), 161 (38)										
						30-40	-										
P125	6,35	308	-				-							√			
P126	6,35	330	240, 320	353	PI	10-40	-		√								
				329	NI	10	329(98), 293(20), 229(32), 211(22), 171(100), 139(5)										
						20	329(100), 229(15), 211(21), 171(48), 139(13)										
						30	229(6), 211(17), 183(8), 171(100), 139(42), 99(7)										
						40	171(100), 139(80), 99(15), 59(5)										
							- [komponente Mr=310-330]										
P127	6,49	310	-				-							√			
P128	6,54	310	-	333	PI	10	315 (100), 297 (6)	√				√					
						20	333 (100), 315 (18), 177 (20)										
						30-40	-										
				309	NI	10	309(5), 291(91), 251(47), 185(12), 171(100), 137(7)										
						20	309(41), 291(75), 251(25), 185(36), 171(100), 137(16), 71(15)										
						30	309(85), 171(91), 97(100), 71(12)										
						40	-										
							- [komponente Mr=310-330]										
P129	6,72	310	-				Isto kao P128	√				√					
P130	6,78	330	325, 240	353	PI	10-40	-	√	√	√	√						
				329	NI	10	329(100), 293(14), 201(82), 171(21)										
						20	329(100), 293(8), 201(45), 199(9), 171(45), 139(7)										
						30	201(53), 199(21), 171(100), 139(17), 127(14), 125(9)										
						40	201(19), 171(100), 127(38)										
							- [komponente Mr=310-330]										
P131	6,86	314	-	337	PI	10-40	-					√					
				313	NI	10	313(100), 295(11), 169(6)										
						20	313(100), 295(31), 169(6)										
						30	313(84), 295(87), 169(100)										
						40	-										
							- [komponente Mr=310-330]										
P132	7,07	330	-				Isto kao P130				√						

Pik	tr	Mw	UV	Precursor Ion m/z	Mode	V _{col} (V)	Produkt jon m/z, relativni udeo	U. dio, - H	U. dio, - K	U. kio, - H	U. kio, - K	P. jud, - H	P. jud, - K	P. lus, - H	P. lus, - K	P. off, - H	P. off, - K		
P133	7,12	286	-	309	PI	10-40	-											√	
				285	NI	10-40	-												
P134	7,35	310	-	333	PI	10	293(36), 275(100), 195(59), 181(44), 155(40), 147(46), 135(60), 123(56), 95(36), 81(45), 69(34)											√	
						20	159(23), 147(29), 135(63), 121(64), 107(42), 95(64), 81(100), 67(79), 55(26)												
						30	145(21), 133(19), 119(34), 109(38), 107(36), 105(34), 95(49), 93(55), 91(40), 81(96), 79(100), 67(65), 55(67)												
						40	131(20), 119(23), 105(44), 95(30), 93(47), 91(39), 81(98), 67(68), 55(100)												
				309	NI	10	309(64), 291(35), 211(6), 197(100), 185(6), 171(13), 111(13)												
						20	309(13), 211(11), 197(100), 171(10), 169(17), 111(17)												
						30	309(7), 197(60), 171(100), 169(89), 111(48)												
						40	197 (100)												
P135	7,42	310	-				Isto kao P134											√	
P136	7,45	310	-				Isto kao P134											√	
P137	7,55	312	325, 290, 240	330	PI	10	295(52), 277(50), 155(100), 123(23), 109(26), 81(26)		√										
						20	155(33), 135(33), 123(26), 119(50), 109(100), 107(27), 95(67), 83(48), 81(88), 69(56), 67(98), 57(31), 55(41)												
						30	109(49), 107(21), 95(34), 93(39), 91(26), 83(30), 79(28), 69(36), 67(100), 57(25), 55(81)												
						40	105(25), 95(30), 93(25), 91(25), 81(66), 79(40), 67(100), 57(30), 55(98)												
				311	NI	10	311(7), 293(40), 275(13), 201(40), 185(28), 171(100), 139(9), 127(6)												
						20	311(24), 293(21), 275(9), 223(7), 201(42), 185(33), 171(100), 139(16)												
						30	201(11), 185(28), 171(100), 139(12), 127(10)												
						40	171(100), 127(13)												
P138	7,69	523	-	524	PI	10	389(49), 283(100), 276(18), 249(39), 242(13), 216(15), 120(29), 86(15)							√					
						20	276(30), 242(19), 236(49), 216(41), 136(16), 131(51), 120(100), 97(22), 86(43)												
						30	276(12), 236(23), 136(13), 131(47), 120(100), 97(38), 86(22)												
						40	134(12), 131(79), 120(100), 105(13), 97(55), 86(44), 79(10)												
				522	NI	10	504(100), 453(8), 426(73), 291(8), 264(23), 247(10), 239(9)												
						20	522(40), 504(64), 426(94), 370(100), 291(61), 281(80), 273(33), 264(78), 247(42), 239(26), 173(14)												
						30	370(35), 291(50), 281(41), 273(46), 264(100), 247(81), 239(30), 200(52), 187(17), 134(10)												
						40	370(11), 264(23), 247(60), 239(33), 200(100), 160(24), 144(14), 134(55)												
P139	7,74	312	325, 290, 240	330	PI	10	295(41), 277(80), 195(15), 161(14), 155(100), 139(37), 123(16), 109(17), 95(17), 81(15)		√										
						20	241(12), 161(34), 157(35), 155(14), 139(25), 123(12), 121(30), 109(100), 95(55), 93(35), 83(54), 81(88), 79(25), 71(12), 69(34), 67(69), 57(28), 55(39)												
						30	109(36), 105(41), 95(53), 93(49), 81(100), 79(51), 67(53), 57(54), 55(63)												
						40	107(7), 105(15), 95(15), 93(10), 91(14), 83(7), 81(37), 79(28), 77(13), 69(18), 67(44), 55(100)												

Pik	tr	Mw	UV	Precursor Ion m/z	Mode	V _{col} (V)	Produkt jon m/z, relativni udeo	U. dio, - H	U. dio, - K	U. kio, - H	U. kio, - K	P. jud, - H	P. jud, - K	P. lus, - H	P. lus, - K	P. off, - H	P. off, - K	
				311	NI	10	293(27), 275(11), 211(9), 201(22), 197(12), 185(35), 171(100), 139(22)											
						20	311(26), 293(33), 211(21), 201(11), 197(12), 185(42), 171(100), 139(17), 121(8)											
						30	185(13), 171(100), 127(49)											
						40	139 (100), 123 (75)											
P140	7,79	312	-				Isto kao P139		√									
P141	7,92	314	-	337	PI	10-40	-		√									
				313	NI	10	313(90), 295(18), 201(100), 171(8)											
						20	313(53), 295(4), 277(16), 201(100), 171(6)											
						30	201(100), 171(23), 127(25)											
						40	171(100), 127(66), 75(40), 58(13), 55(14)											
				- [komponente Mr=310-330]														
P142	7,95	489	-	490	PI	10	462(5), 355(41), 349(28), 343(37), 283(100), 208(36), 120(84)					√		√			√	
						20	349(8), 343(16), 283(15), 216(13), 208(14), 202(20), 120(100), 97(14)											
						30	208(9), 202(27), 120(100), 97(25)											
						40	202(10), 120(100), 97(27)											
				488	NI	10	419(10), 392(100)											
						20	488(7), 419(11), 392(100), 376(8), 281(18), 264(34), 257(11)											
						30	392(33), 376(13), 281(26), 264(100), 257(23), 189(5), 166(12), 134(13)											
						40	376(7), 281(14), 264(100), 257(18), 237(16), 189(16), 166(5), 134(59), 112(5)											
P143	7,97	455	-	456	PI	10	428(7), 343(53), 315(20), 249(89), 208(61), 182(18), 136(17), 97(5), 86(100)										√	
						20	343(17), 315(12), 230(15), 208(28), 202(40), 182(14), 136(13), 97(19), 86(100)											
						30	230(13), 208(21), 202(44), 134(6), 97(55), 86(100)											
						40	202(22), 160(16), 134(8), 97(73), 86(100)											
				454	NI	10	385(21), 358(100)											
						20	454(8), 385(11), 358(100), 342(5), 247(20), 223(13)											
						30	358(50), 342(18), 247(100), 223(71), 166(7), 134(27)											
						40	247(100), 230(10), 223(33), 166(11), 134(98), 95(6)											
P144	8,07	270	-	293	PI	10-40	-				√							
				269	NI	10	269(100), 251(38), 171(11), 155(12)											
						20	269(100), 251(46), 171(10), 155(10)											
						30	251(32), 233(100), 155(54), 111(37)											
						40	-											
P145	8,09	523	-	524	PI	10-40	-							√			√	
				522	NI	10-40	-											

Pik	tr	Mw	UV	Precursor Ion m/z	Mode	V _{col} (V)	Produkt jon m/z, relativni udeo	U. dio, - H	U. dio, - K	U. kio, - H	U. kio, - K	P. jud, - H	P. jud, - K	P. lus, - H	P. lus, - K	P. off, - H	P. off, - K						
P146	8,09	489		490	PI	10	377(24), 355(62), 315(23), 249(100), 216(10), 202(11), 136(8), 131(48), 86(40)						√										
						20	377(26), 315(17), 249(21), 242(79), 216(22), 202(43), 131(100), 86(100)																
						30	242(23), 202(24), 131(100), 86(59)																
						40	242(8), 202(13), 131(100), 103(14), 86(33)																
				488	NI	10	488(100), 470(52), 392(20), 341(8), 264(16), 247(73)																
						20	488(100), 470(12), 273(12), 264(26), 247(45)																
						30	309(11), 273(13), 264(33), 247(100), 160(6), 134(25)																
						40	264(12), 247(100), 160(5), 134(71), 119(4)																
P147	8,11	278	460, 360	279	PI	10	149 (100), 57 (23)				√												
						20	149 (100), 57 (23)																
						30	149 (100), 121 (6), 57 (19)																
						40	149(100), 121(40), 93(38), 65(23), 57(20)																
P148	8,17	278	-	279	PI	10	149 (100)				√												
						20	149 (100), 57 (6)																
						30	149(100), 121(13), 93(7), 57(9)																
						40	149(100), 121(72), 93(44), 65(34), 57(6)																
P149	8,17	294	-	293	NI	10	293(21), 275(100), 235(18), 231(10), 195(7), 183(6), 171(34), 121(7)		√														
						20	293(85), 275(100), 235(16), 231(17), 195(14), 183(15), 171(44), 121(13)																
						30	171 (100)																
						40	-																
P150	8,17	370	-	415	PI	10-40	-											√					
				393	NI	10-40	-																
P151	8,20	278	-				Isto kao P147 i P148				√												
P152	8,35	270	-	271	PI	10-40	-				√												
				269	NI	10-40	-																
P153	8,45	296	-	319	PI	10	301 (100), 163 (15)					√											
						20	319(14), 301(6), 163(100), 85(41)																
						30	163 (38), 85 (100)																
						40	85 (100)																
				295	NI	10	295(51), 277(100), 195(17), 183(7), 171(43)																
						20	295(100), 277(96), 195(26), 183(8), 171(53)																
						30	295(48), 277(73), 195(16), 171(100), 97(19), 57(5)																
						40	171(14), 97(100), 57(25)																

Pik	tr	Mw	UV	Precursor Ion m/z	Mode	V _{col} (V)	Produkt jon m/z, relativni udeo	U. dio, - H	U. dio, - K	U. kio, - H	U. kio, - K	P. jud, - H	P. jud, - K	P. lus, - H	P. lus, - K	P. off, - H	P. off, - K						
P154	8,53	294	-	295	PI	10	277(100), 241(12), 161(21), 151(18), 149(13), 147(11), 135(15), 95(10)		√		√		√					√					
						20	277(37), 161(42), 151(35), 147(25), 135(19), 133(39), 121(14), 119(15), 109(30), 107(40), 95(85), 93(52), 83(28), 81(100), 69(63), 67(47), 55(33)																
						30	119(13), 105(17), 95(48), 93(25), 81(100), 79(33), 69(39), 67(36), 55(54), 53(25)																
						40	105(14), 95(36), 91(35), 81(100), 79(44), 69(24), 67(51), 55(70), 53(91)																
				293	NI	10	293(100), 197(9), 185(30)																
						20	293(100), 249(5), 197(11), 185(24)																
						30	293(23), 185(100), 123(73)																
						40	123 (100)																
				P155	8,55	676	-	676	PI	10-40	-			√									
								721	NI	10-40	-												
P156	8,73	678	-	701	PI	10-40	-					√		√									
				723	NI	10-40	-																
P157	8,79	296	-	297	PI	10	279(100), 261(22), 243(16), 165(15), 163(32), 153(18), 147(16), 137(27), 135(31), 125(17), 95(27), 71(20)		√		√												
						20	135(20), 107(38), 105(21), 97(60), 95(100), 83(22), 81(48), 79(30), 71(44), 69(34), 67(71), 57(26), 55(60)																
						30	107(31), 97(45), 95(33), 93(34), 81(67), 79(50), 69(46), 67(48), 57(16), 55(100)																
						40	107(31), 97(45), 95(33), 93(34), 81(67), 79(50), 69(46), 67(48), 55(100)																
				295	NI	10	295(100), 277(96), 195(16), 171(44)																
						20	295(64), 277(100), 195(25), 171(41)																
						30	171 (100)																
						40	59 (100)																
				P158	8,79	514	-	513	PI	10	513(48), 277(100), 253(17)				√						√		
										20	277 (100), 253 (7)												
30	277 (100), 253 (17)																						
40	-																						
P159	8,83	678	-	701	PI	10-40	-				√		√		√		√						
						723	NI	10	397 (100)														
				723	NI	20	415 (87), 397 (100)																
						30	473(15), 415(10), 397(6), 279(100), 189(12), 145(15)																
						40	279 (100)																
P160	9,04	516	-	539	PI	10-40	-				√		√										
						561	NI	10	515(100), 279(91)														
				20	279 (100), 253 (21)																		

Pik	tr	Mw	UV	Precursor Ion m/z	Mode	V _{col} (V)	Produkt jon m/z, relativni udeo	U. dio, - H	U. dio, - K	U. kio, - H	U. kio, - K	P. jud, - H	P. jud, - K	P. lus, - H	P. lus, - K	P. off, - H	P. off, - K
						30-40	279 (100)										
P161	9,16	323	-	324	PI	10-40	-		√		√				√		
				368	NI	10-40	-										
P162	9,18	474	-	497	PI	10	479 (100)					√					
						20	497 (37), 479 (100), 409 (6)										
						30	497 (75), 479 (100)										
						40	-										
				473	NI	10-40	-										
P163	9,23	354	-	377	PI	10	293(21), 275(100), 235(18), 231(10), 195(7), 183(6), 171(34), 121(7)		√								
						20	293(85), 275(100), 235(16), 231(17), 195(14), 183(15), 171(44), 121(13)										
						30	171 (100)										
						40	97 (100)										
				399	NI	10-40	-										
P164	9,31	354	-				Isto kao P163		√								

8.4. KVANTITATIVNA ANALIZA ODABRANIH FENOLNIH JEDINJENJA U EKSTRAKTIMA LC-MS/MS METODOM

Tabela 8.4. Površine pikova 31 standardnog jedinjenja identifikovanog u ispitivanim ekstraktima u 15 različitim koncentracija, podaci za konstruisanje kalibracionih krivih.

Koncentracija (ng/mL)	25000	12500	6250	3125	1563	781	391	195	97,7	48,8	24,4	12,2	6,10	3,05	1,53	0,00
Jedinjenje	Površina pikova															
p-OH-benzoeva k.	9841	7910	5861	3853	2446	1463	851	469	295	149	116	68	30	32	0	0
protokatehinska k.	30390	20087	12499	6974	3651	2184	1148	627	285	165	77	37	19	0	0	0
2,5-dihidroksibenzoeva k.	26111	14709	8775	5118	2724	1509	856	442	233	126	68	14	19	0	0	0
p-kumarinska k.	48831	30853	20596	12234	7524	4163	2307	1252	675	348	202	87	59	35	0	0
galna k.	31092	19841	12055	6682	3659	2150	1117	544	238	129	59	12	12	8	6	0
eskuletin	38642	23853	14859	9963	6016	3746	2303	1282	699	342	200	96	75	45	40	0
kafena k.	52355	33404	21239	13469	7820	4651	2519	1375	710	369	217	90	61	13	0	0
hinska kiselina	6180	3248	1828	992	583	357	180	94	47	18	11	0	0	0	0	0
skopoletin	24705	19190	14071	9202	5720	3370	1930	1071	566	322	169	76	57	26	20	0
ferulna k.	11293	7607	5178	2976	1821	1007	525	258	129	65	33	0	0	0	0	0
siringinska k.	7926	4590	2820	1518	873	448	248	121	63	30	16	0	0	0	0	0
apigenin	36642	24387	16216	10812	6041	3324	1843	936	481	235	109	55	29	10	0	0
naringenin	40249	26053	17772	11280	7181	4274	2389	1299	720	326	181	78	31	17	9	0
luteolin	56925	35727	24678	16315	10274	6096	3552	1867	1044	494	240	118	63	33	0	0
kemferol	284036	185331	120302	74715	43913	23323	13166	6900	3659	1788	919	413	197	134	45	0
katehin	7491	4753	2967	1783	945	529	311	159	88	59	17	13	0	0	0	0
epikatehin	5874	3886	2567	1574	913	478	271	152	81	83	50	18	0	0	0	0
krizoeriol	90237	65113	49321	33444	22470	13821	8222	4538	2244	1243	599	303	148	68	35	0
kvercetin	143610	94802	62360	41438	23866	9949	4486	2296	1112	325	37	13	7	0	0	0
izoramnetin	166987	105779	69851	43133	23524	9697	4863	2659	1410	638	207	57	36	5	0	0
hlorogenska k,	45542	27398	17115	9746	5451	2899	1597	760	399	225	109	45	38	6	0	0
sekoizolaricirezinol	3602	2562	1714	972	584	322	169	84	43	24	9	0	0	0	0	0
viteksin	162651	89801	44495	26834	12414	6610	3389	1783	852	440	212	89	66	17	0	0
apigenin-7-O-glukozid	33630	28709	24032	18477	13290	9026	5560	3287	1703	948	467	226	134	46	24	0
luteolin-7-O- glukozid	134253	88722	56323	31615	17116	9852	5699	2998	1492	729	373	184	101	53	10	0
kvercitrin	61064	35836	20261	11655	6274	3358	1803	960	534	268	108	65	30	12	0	0
kemferol-3-O- glukozid	60638	37417	23253	13681	7624	4196	2436	1284	687	342	200	88	54	23	6	0
kvercetin-3-O- glukozid	64875	37809	21452	11139	6135	3274	1834	870	438	227	96	64	33	10	0	0
amentoflavan	218175	156761	117676	79741	49762	28526	17053	9197	4507	2382	1127	562	289	140	79	0
hiperozid	16151	10151	5366	3047	1589	790	405	223	94	40	28	11	4	3	0	0
rutin	49819	29335	17459	9754	5094	2949	1498	796	437	238	96	60	27	13	9	7

Tabela 8.5. Površine pikova i koncentracije detektovanih jedinjenja očitane sa kalibracionih krivih u metanolnim ekstraktima **herbi**.

Uzorak:		U.dio1	U.dio3	U.dio4	U.dio5	U.dio6	U.dio7	U.dio8	U.kio	P.jud1	P.jud2	P.off1	P.off2	P.off3	P.off4	P.lus1	P.ser
p-OH-benzoeva k.	P pika*	242	73	135	269	32	76	85	101	157	85	431	151	87	52	77	151
	ng/mL**	36,82	24,07	21,20	58,94	-	17,18	20,18	16,42	51,76	20,18	153,6	47,78	28,66	17,22	22,74	28,00
	mg/mL***	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
protokatehinska k.	P pika	415	544	578	607	441	417	208	235	571	292	792	294	209	362	371	691
	ng/mL	61,07	142,4	109,1	115,1	124,6	131,0	64,76	49,20	150,0	91,05	229,1	82,18	49,29	91,57	104,3	184,0
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
p-kumarinska k.	P pika	4364	963	2409	1997	490	724	1136	395	528	372	653	569	418	518	227	248
	ng/mL	334,3	117,7	252,7	205,6	64,56	109,7	178,0	30,90	68,63	53,10	86,95	75,39	54,05	67,33	28,77	30,05
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
galna k.	P pika	-	-	41	11	31	16	18	-	90	84	-	-	-	-	58	17
	ng/mL	-	-	7,28	-	-	-	-	-	30,49	36,60	-	-	-	-	22,23	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Eskuletin	P pika	111	143	159	153	108	116	317	157	129	117	116	160	94	151	173	91
	ng/mL	11,21	17,56	19,93	19,17	12,61	13,18	42,27	30,10	15,87	13,33	13,64	19,30	11,54	18,51	20,97	11,16
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
kafena k.	P pika	3780	7460	6840	12848	5554	7230	3722	4910	2651	3297	1231	2643	3531	6724	2753	743
	ng/mL	301,5	929,6	629,8	1260	783,0	1385	600,0	605,8	299,2	522,8	154,1	344,4	405,3	823,8	359,7	80,30
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
hinska kiselina	P pika	783	289	243	1039	682	427	164	3068	1353	1557	450	731	171	450	967	359
	ng/mL	924,4	505,4	299,7	1292	1517	1290	347	5003	2604	5459	960	1637	287,4	807,1	2227	636,0
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
skopoletin	P pika	1029	430	648	1421	323	176	204	132	-	-	-	-	-	-	-	-
	ng/mL	103,5	68,75	77,72	181,5	51,4	26,84	31,54	8,815	-	-	-	-	-	-	-	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
ferulna k.	P pika	271	103	196	317	48	57	104	118	88	36	55	76	41	59	61	41
	ng/mL	90,51	77,50	68,39	112,6	39,57	41,80	77,88	36,16	68,10	29,45	44,54	59,13	35,00	48,44	48,76	35,00
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
katehin	P pika	-	-	-	-	-	-	-	-	991	395	-	-	-	-	30	-
	ng/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	1060	542,4	-	-	-	-	-	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
epikatehin	P pika	-	-	-	-	-	-	-	120	1820	2271	505	69	318	424	1431	10
	ng/mL	-	-	-	-	-	-	-	204,9	2472	5738	658,5	-	341	482	2082	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Uzorak:		U.dio1	U.dio3	U.dio4	U.dio5	U.dio6	U.dio7	U.dio8	U.kio	P.jud1	P.jud2	P.off1	P.off2	P.off3	P.off4	P.lus1	P.ser
hlorogenska k.	P pika	39152	17686	63920	21702	14540	21516	14346	20611	5358	1840	2434	2696	1550	2460	3734	1510
	ng/mL	5717	2760	11303	3490	2206	3456	2172	2737	1121	466,6	553	614	199	417	833	189
	mg/mL	1	0,25	2	0,2	0,125	0,25	0,25	0,20	2	2	2	2	2	2	2	2
viteksin	P pika	-	-	-	-	-	-	-	22649	-	-	-	-	-	-	-	-
	ng/mL	-	-	-	-	-	-	-	2648	-	-	-	-	-	-	-	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
apigenin-7-O-glukozid	P pika	-	15	25	39	17	-	-	89	18	212	80	14	261	49	31	36
	ng/mL	-	-	-	3,156	-	-	-	5,468	-	11,18	-	-	23,28	-	-	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
luteolin-7-O- glukozid	P pika	11	78	57	85	46	127	-	7447	33	132	11	-	921	-	54	15
	ng/mL	-	-	2,457	3,127	-	7,95	-	683,8	-	8,300	-	-	43,70	-	-	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
kvercitrin	P pika	72	-	11	13	-	-	18	-	41	92	-	-	-	-	16	-
	ng/mL	7,60	-	-	-	-	-	4,09	-	6,64	18,77	-	-	-	-	-	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
kemferol-3-O- glukozid	P pika	1755	957	636	2189	4437	1006	375	45	1942	2234	492	710	290	691	916	-
	ng/mL	119,6	100,9	61,62	246,7	617,6	160,2	54,35	-	208,8	376,0	61,73	89,13	32,90	73,4	115,3	4,4
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
kvercetin-3-O- glukozid	P pika	4585	6974	6180	19587	26069	14366	3293	181	14025	21714	3176	3180	2169	4316	6875	-
	ng/mL	441,4	980	791,6	2245	5403	4101	770	167,7	2028	6528	565,4	566,1	303	602	1258	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
hiperozid	P pika	-	-	-	-	-	-	-	165	-	-	-	-	-	-	-	-
	ng/mL	-	-	-	-	-	-	-	148,6	-	-	-	-	-	-	-	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
rutin	P pika	18512	56853	18271	76329	14051	45479	22609	35	18247	25389	29290	25220	27450	48475	25063	45
	ng/mL	2760	15122	2857	14628	1920	21955	8944	5,529	2559	3677	8881	7477	6548	12477	7427	11,78
	mg/mL	1	2	2	2	0,125	2	2	2	0,20	0,25	2	2	2	2	2	2

* površina pika za dato jedinjenje; ** koncentracija koja odgovara P pika (sa kalibracione krive); *** koncentracija ekstrakta korišćenog u analizi

Tabela 8.6. Površine pikova i koncentracije detektovanih jedinjenja očitane sa kalibracionih krivih u metanolnim ekstraktima **korena**.

Uzorak:		U.dio1	U.dio3	U.dio4	U.dio5	U.dio6	U.dio7	U.dio8	U.kio	P.jud1	P.jud2	P.off1	P.off2	P.off3	P.off4	P.lus1
p-OH-benzoeva k.	P pika	242	281	267	403	57	136	77	942	291	218	98	151	96	247	133
	ng/mL	36,82	94,46	58,38	96,78	16,14	37,67	17,51	190,9	96,87	68,08	29,75	66,73	31,61	81,92	41,60
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Uzorak:		U.dio1	U.dio3	U.dio4	U.dio5	U.dio6	U.dio7	U.dio8	U.kio	P.jud1	P.jud2	P.off1	P.off2	P.off3	P.off4	P.lus1
protokatehinska k.	P pika	117	158	201	-	70	136	70	165	361	459	370	223	262	687	249
	ng/mL	15,95	43,62	30,35	21,16	19,00	18,25	22,48	34,93	91,29	68,08	104,0	61,97	63,89	182,4	69,35
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
p-kumarinska k.	P pika	3762	3189	3699	4241	424	778	2945	2035	251	121	663	196	600	750	59
	ng/mL	287,5	458,9	399,6	461,0	55,54	118,5	511,7	181,7	30,49	13,70	88,33	24,58	77,82	96,20	6,120
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
kafena k.	P pika	129	119	350	109	298	-	85	-	116	136	2343	160	88	83	150
	ng/mL	11,09	12,20	23,68	7,850	34,70	-	8,170	+	11,20	15,61	302,9	17,40	8,195	7,700	16,10
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
hinska kiselina	P pika	268	423	500	577	313	308	142	261	466	1966	323	539	42	173	789
	ng/mL	286,2	896,0	621,3	717,5	639	862	268	-	837,4	7018	662,0	1172	52,10	291,1	1780
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Skopoletin	P pika	1850	887	1715	2600	734	620	613	737	-	-	-	-	-	8	-
	ng/mL	188,5	142,5	223,1	357,1	118,0	105,2	103,9	56,26	-	-	-	-	-	-	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
ferulna k.	P pika	144	102	163	142	24	51	59	165	115	28	134	235	46	182	137
	ng/mL	49,20	76,57	56,47	48,91	22,07	38,16	43,04	50,02	84,72	25,02	97,18	157,2	38,85	121,1	99,07
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
siringinska	P pika	40	47	38	30	10	10	24	-	22	-	29	18	-	23	-
	ng/mL	36,09	69,27	-	-	-	-	40,24	-	-	-	43,78	-	-	-	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Katehin	P pika	-	-	-	-	-	-	-	-	867	474	153	-	58	103	290
	ng/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	916,2	666,9	153,3	-	-	73,70	315,5
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
epikatehin	P pika	-	-	-	-	-	-	-	-	5369	4485	3427	2470	1229	4010	2222
	ng/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	9867	14689	3067	2060	1597	6363	1814
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0,400	0,125	2	2	0,125
hlorogenska k.	P pika	903	293	534	441	1094	279	307	26	4727	14949	27417	28808	4144	9299	22862
	ng/mL	-	58	58,70	50,20	243,8	66,27	72,96	-	967,0	5712	8382	8992	824,8	2099	6582
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
sekoizolaricirezinol	P pika	107	368	255	121	37	84	56	-	-	-	-	-	-	-	-
	ng/mL	124,8	721,3	398,9	179,3	84,71	193,3	128,3	-	-	-	-	-	-	-	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Uzorak:		U.dio1	U.dio3	U.dio4	U.dio5	U.dio6	U.dio7	U.dio8	U.kio	P.jud1	P.jud2	P.off1	P.off2	P.off3	P.off4	P.lus1
kvercetin-3-O-glukozid	P pika	21	-	129	24	33	-	8	-	963	849	194	321	457	630	546
	ng/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	137,0	186,8	25,60	48,30	67,37	91,00	89,00
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
amentoflavon	P pika	97	-	306	147	-	-	-	-	811	576	194	21	334	46	9
	ng/mL	-	-	2,798	1,788	-	-	-	-	10,98	12,62	-	-	-	-	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
rutin	P pika	205	30	263	72	125	32	17	-	1999	1123	553	813	762	1584	1257
	ng/mL	17,67	-	37,13	10,70	-	3,820	-	-	313,7	284	118,0	176	141,0	218,0	274
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

* površina pika za dato jedinjenje; ** koncentracija koja odgovara P pika (sa kalibracione krive); *** koncentracija ekstrakta korišćenog u analizi

Tabela 8.7. Površine pikova i koncentracije detektovanih jedinjenja očitane sa kalibracionih krivih u metanolnim ekstraktima lista.

Uzorak:		U.dio1	U.dio4	U.dio5	U.dio6	U.dio7	U.kio	P.jud1	P.jud2	P.off1	P.off2	P.off3	P.off4	P.lus1
p-OH-benzoeva k.	P pika	245	211	167	84	76	57	97	51	120	117	51	63	-
	ng/mL	37,29	42,59	30,20	25,07	17,18	8,373	31,94	9,010	37,17	36,15	-	20,81	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
protokatehinska k.	P pika	896	1636	743	409	502	243	329	341	1264	186	89	540	394
	ng/mL	142,9	330,0	143,5	115,3	158,8	50,85	82,42	106,6	378,2	51,51	81,58	141,3	110,9
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
p-kumarinska k.	P pika	329	289	666	-	289	310	372	313	129	107	332	275	136
	ng/mL	20,52	-	52,58	-	40,00	22,38	47,74	43,80	15,53	12,57	48,57	34,00	16,48
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
galna k.	P pika	21	37	-	81	10	-	52	75	44	-	9	-	23
	ng/mL	4,760	6,640	-	30,01	-	-	-	33,07	-	-	-	-	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
eskuletin	P pika	121	198	119	93	78	149	110	126	193	162	-	268	102
	ng/mL	12,33	24,89	14,87	10,68	7,770	28,43	13,54	14,61	23,54	19,55	-	31,69	11,83
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
kafena k.	P pika	6897	6334	18211	8536	7500	5543	4093	5995	4149	1222	181	9513	4810
	ng/mL	590,8	578,4	1856	1336	1464	678,0	474,9	1068	562,3	153,0	1247	1250	663,8
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
hinska kiselina	P pika	2038	579	1054	854	383	1206	1262	3166	445	338	71	750	1655
	ng/mL	2625	720	1311	1942	1132	1650	2414	11760	948	697,0	875,3	1383	4082
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Uzorak:		U.dio1	U.dio4	U.dio5	U.dio6	U.dio7	U.kio	P.jud1	P.jud2	P.off1	P.off2	P.off3	P.off4	P.lus1
skopoletin	P pika	705	374	1167	200	319	60	-	-	-	-	-	29	-
	ng/mL	70,30	42,68	146,5	31,20	51,16	3,965	-	-	-	-	-	-	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
ferulna k.	P pika	130	79	291	81	58	84	38	17	84	6	58	102	-
	ng/mL	44,33	26,37	103,3	62,54	42,42	24,94	32,65	19,13	64,57	-	77,50	76,89	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
katehin	P pika	-	-	-	-	-	-	578	109	-	-	37	-	-
	ng/mL	-	-	-	-	-	-	588,8	129,9	-	-	59,90	-	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
epikatehin	P pika	-	-	-	-	-	78	1268	796	389	-	244	-	955
	ng/mL	-	-	-	-	-	158,2	1653	1237	471,2	-	1709	-	1383
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
hlorogenska k.	P pika	82678	33941	21827	17762	39164	30147	5980	1639	4319	384	339	800	6415
	ng/mL	13401	5323	3514	2774	19504	4192	1274	411,5	982	79,46	862,0	155,0	1528
	mg/mL	2	2	0,125	0,125	2	0,2	2	2	2	2	2	2	2
viteksin	P pika	-	-	-	-	-	23629	-	-	-	-	-	-	-
	ng/mL	-	-	-	-	-	2772	-	-	-	-	-	-	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
luteolin-7-O-glukozid	P pika	19	43	74	61	-	8409	12	17	12	-	-	-	17
	ng/mL	-	2,156	2,851	-	-	771,8	-	-	-	-	11,45	-	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
kemfeol-3-O-glukozid	P pika	606	27	1275	5388	235	45	1675	1280	432	17	111	122	410
	ng/mL	38,06	-	139,2	777,8	31,28	-	178,6	207,2	54,24	-	108,8	16,30	51,51
	mg/mL	-	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
hiperozid	P pika	-	-	-	-	-	146	-	-	-	-	-	-	-
	ng/mL	-	-	-	-	-	133,0	-	-	-	-	-	-	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
kvercetin-3-O-glukozid	P pika	3176	81	18713	30471	2186	185	9535	8599	3027	31	984	786	3451
	ng/mL	301,1	4,800	2149	-	497,0	171,3	1353	2281	538,1	-	951	112,0	616,0
	mg/mL	-	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
rutin	P pika	16436	290	51972	10930	14006	44	20095	24436	46895	574	5169	14750	25697
	ng/mL	2412	41,14	9245	1453	4892	7,891	2844	3525	15600	123	24953	3332	7642
	mg/mL	2	2	2	0,125	2	2	0,125	0,400	2	2	2	2	2

* površina pika za dato jedinjenje; ** koncentracija koja odgovara P pika (sa kalibracione krive); *** koncentracija ekstrakta korišćenog u analizi

Tabela 8.8. Površine pikova i koncentracije detektovanih jedinjenja očitane sa kalibracionih krivih u metanolnim ekstraktima **cveta**.

Uzorak:		U.dio1	U.dio4	U.dio5	U.dio6	U.dio7	U.dio8	P.jud1	P.jud2	P.off1	P.off2	P.off3	P.off4	P.lus1
p-OH-benzoeva k.	P pika	191	183	312	77	80	341	1059	132	446	409	115	364	333
	ng/mL	28,72	34,71	71,08	22,74	18,51	121,2	383,4	36,27	159,9	144,5	37,86	122,0	114,3
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
protokatehinska k.	P pika	438	363	274	446	265	586	2800	772	960	478	150	613	770
	ng/mL	64,91	64,18	45,59	126,0	82,55	186,8	834,8	250,8	281,0	135,4	33,10	161,9	222,5
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
p-kumarinska k.	P pika	241	393	580	159	109	439	1040	418	294	192	351	324	118
	ng/mL	13,67	21,05	42,65	19,58	11,80	63,80	129,4	60,40	37,85	24,04	44,82	41,02	14,05
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
galna k.	P pika	97	68	70	156	72	40	121	265	49	53	0	24	22
	ng/mL	17,41	11,24	11,51	54,73	31,89	-	39,55	103,7	-	20,53	-	-	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
eskuletin	P pika	114	125	151	169	72	873	290	124	147	206	-	137	118
	ng/mL	11,54	15,63	18,92	20,45	6,920	127,2	34,02	14,33	17,63	25,21	-	16,84	13,89
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
kafena k.	P pika	6487	8769	13129	4028	5233	1765	888	1883	607	306	3688	2374	628
	ng/mL	549,8	828,1	1290	544,1	898,3	264,4	96,40	283,4	73,70	35,70	424,6	266,5	76,40
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
hinska kiselina	P pika	738	431	1392	2228	775	297	1568	8517	1342	1397	1136	1150	1297
	ng/mL	867,4	535,1	1729	5826	2554	823	3063	x	3211	3360	2155	2183	3090
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
skopoletin	P pika	423	323	673	327	93	314	-	-	-	-	-	-	-
	ng/mL	41,62	36,24	80,96	52,00	13,07	50,30	-	-	-	-	-	-	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
ferulna k.	P pika	6487	502	281	54	113	96	46	4	38	32	53	119	46
	ng/mL	549,8	181,7	99,36	43,84	82,58	68,51	38,85	-	32,37	27,99	44,08	87,07	38,14
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
katehin	P pika	76	159	2247	825	81	355	1130	764	142	19	-	-	-
	ng/mL	49,21	153,0	2034	1022	92,15	481,3	1225	1180	140,5	-	-	-	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
epikatehin	P pika	-	-	-	35	-	25	793	3110	4354	1841	1358	1340	432
	ng/mL	-	-	-	-	-	-	983	8701	10055	3069	1783	1757	537,2
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Uzorak:		U.dio1	U.dio4	U.dio5	U.dio6	U.dio7	U.dio8	P.jud1	P.jud2	P.off1	P.off2	P.off3	P.off4	P.lus1
hlorogenska k.	P pika	109940	24112	26660	33357	21297	28259	2887	3143	4945	8513	5551	15258	3369
	ng/mL	19291	3941	4430	5775	3416	12411	520	724,9	1144	2090	1168	3625	768,6
	mg/mL	2	0,250	0,125	0,100	0,200	2	2	2	2	2	2	2	2
naringenin	P pika	13	-	-	-	-	-	121	111	277	271	125	151	13
	ng/mL	-	-	-	-	-	-	22,65	16,65	44,05	43,12	23,31	27,56	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
kemferol-3- <i>O</i> -glukozid	P pika	26495	14122	11761	3280	4681	358	1501	1487	3247	4818	1678	1573	1055
	ng/mL	2058	1410	1206	439,1	854,7	51,54	159,3	243,1	434,3	680,1	178,9	167,2	133,1
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	P pika	32544	46418	49608	26081	25328	1804	5501	16252	12835	11201	11165	9570	5021
	ng/mL	3398	5271	5642	5406	7772	406	770,0	4712	2434	2103	1595	1358	907,0
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
rutin	P pika	12466	52128	9132	21411	39685	11983	32112	43285	35536	25525	24252	30039	11351
	ng/mL	1777	9277	1184	3049	18237	3984	7791	20502	11131	7583	5716	7234	3019
	mg/mL	2	2	0,125	0,100	2	2	2	2	2	2	2	2	2

* površina pika za dato jedinjenje; ** koncentracija koja odgovara P pika (sa kalibracione krive); *** koncentracija ekstrakta korišćenog u analizi

Tabela 8.9. Površine pikova i koncentracije detektovanih jedinjenja očitane sa kalibracionih krivih u metanolnim ekstraktima **stabljike**.

Uzorak:		U.dio1	U.dio4	U.dio5	U.dio6	U.dio7	U.dio8	P.jud1	P.jud2	P.off1	P.off2	P.off3	P.off4	P.lus1
p-OH-benzoeva k.	P pika	195	222	159	100	94	79	79	201	37	44	51	94	45
	ng/mL	29,35	45,69	27,95	25,22	23,20	18,18	26,04	61,51	9,600	11,88	16,90	30,95	12,21
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
protokatehinska k.	P pika	162	191	122	151	99	181	231	664	58	108	89	203	321
	ng/mL	22,16	28,26	13,85	47,16	31,27	56,40	55,34	213,3	15,66	29,60	16,42	47,64	89,91
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
p-kumarinska k.	P pika	7624	6835	3332	999	4108	1715	861	205	1802	1308	332	734	140
	ng/mL	587,9	752,3	357,9	155,0	768,7	278,2	109,2	26,80	249,6	178,6	42,15	94,29	17,02
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
kafena k.	P pika	301	960	906	278	191	277	329	328	61	66	181	111	65
	ng/mL	23,89	65,80	61,94	36,41	23,65	36,26	34,50	43,77	-	-	18,30	10,70	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
hinska kiselina	P pika	122	67	145	191	156	35	683	2186	101	133	71	66	380
	ng/mL	110,5	78,66	176,7	443,0	318,0	-	1253	7868	153,0	225,0	104,7	95,60	795,0
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Uzorak:		U.dio1	U.dio4	U.dio5	U.dio6	U.dio7	U.dio8	P.jud1	P.jud2	P.off1	P.off2	P.off3	P.off4	P.lus1
skopoletin	P pika	1430	876	791	1034	569	169	-	-	-	-	-	-	-
	ng/mL	144,8	107,5	96,35	187,6	95,77	25,67	-	-	-	-	-	-	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
ferulna k.	P pika	366	343	141	63	67	74	111	29	89	99	58	100	59
	ng/mL	118,7	122,2	48,55	45,55	48,11	52,72	82,34	25,57	67,93	74,59	47,72	75,66	47,36
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
katehin	P pika	6	-	-	-	-	-	2217	507	-	-	37	-	59
	ng/mL	-	-	-	-	-	-	2632	720,5	-	-	-	-	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
epikatehin	P pika	-	-	-	-	-	-	2887	2702	73	37	244	-	1060
	ng/mL	-	-	-	-	-	-	4210	7214	64,10	-	244	-	1556
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
hlorogenska k.	P pika	14634	25318	30054	12099	5331	12124	3792	1807	555	318	339	506	909
	ng/mL	1967	3747	4606	4443	1600	4454	739	457,4	119,1	64,17	72,00	104,0	201,0
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
kemferol-3-O-glukozid	P pika	118	248	412	314	58	20	2100	5564	69	94	111	131	617
	ng/mL	-	13,51	33,94	44,28	-	-	227,1	1049	9,420	12,48	15,30	17,20	77,40
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
kvercetin-3-O-glukozid	P pika	1171	5882	7766	4438	1001	1279	18586	45299	626	694	984	1109	7304
	ng/mL	102,7	765,0	961,6	1072	221	284,4	2744	15422	102,9	115,0	139,0	157,0	1340
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
rutin	P pika	16826	17394	27468	44409	13114	14620	51759	29378	3510	3005	5169	3582	15377
	ng/mL	2476	2703	4505	21239	4490	5170	13491	4319	790	669	1047	678	4269
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	0,400	2	2	2	2	2

* površina pika za dato jedinjenje; ** koncentracija koja odgovara P pika (sa kalibracione krive); *** koncentracija ekstrakta korišćenog u analizi

Tabela 8.10. Površine pikova i koncentracije detektovanih jedinjenja očitane sa kalibracionih krivih u vodenim ekstraktima (infuzima) **herbi, lista i korena.**

Uzorak:		U.dio1	U.dio6	P.jud1	P.jud2	P.off2	P.off3	U.dio1	P.jud1	P.off2	P.off3	U.dio1	P.jud1
		HERBA						LIST				KOREN	
protokatehinska k.	P pika	219	459	809	419	229	169	256	659	91	218	116	844
	ng/mL	32,01	69,37	123,8	63,15	33,57	24,23	37,77	100,5	12,08	31,86	15,97	129,3
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Uzorak:		U.dio1	U.dio6	P.jud1	P.jud2	P.off2	P.off3	U.dio1	P.jud1	P.off2	P.off3	U.dio1	P.jud1
		HERBA						LIST				KOREN	
p-kumarinska k.	P pika	750	316	388	413	351	380	144	473	90	587	1085	-
	ng/mL	43,57	19,34	23,28	24,66	21,25	22,84	10,02	27,98	7,126	34,34	63,06	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
hinska kiselina	P pika	1584	2476	3390	5356	1855	708	3464	2948	1582	1353	213	739
	ng/mL	2037	3249	4510	7292	2403	865	4613	3897	2035	1726	209	906
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
skopoletin	P pika	103	144	-	-	-	-	73	-	-	-	344	-
	ng/mL	7,458	14,47	-	-	-	-	-	-	-	-	33,91	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
katehin	P pika	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	186
	ng/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	126,5
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
epikatehin	P pika	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1002
	ng/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	661,0
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
hlorogenska k.	P pika	1315	1735	1139	161	396	87	707	159	23	31	480	1157
	ng/mL	217,0	294,6	186,0	27,52	63,78	16,32	113,4	27,22	6,704	7,902	76,99	189,1
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
sekoizolaricirezinol	P pika	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	113	-
	ng/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	96,56	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
luteolin-7-O-glukozid	P pika	1062	-	-	167	77	137	687	-	-	-	58	-
	ng/mL	41,48	-	-	7,140	3,124	5,816	28,12	-	-	-	34,36	-
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
kemferol-3-O-glukozid	P pika	268	-	78	129	164	-	-	39	-	-	131	64
	ng/mL	18,45	-	5,720	9,292	11,67	-	-	-	-	-	9,429	4,717
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
kvercetin-3-O-glukozid	P pika	2541	189	968	785	491	-	1513	243	140	-	1848	654
	ng/mL	-	9,672	50,04	41,16	26,18	-	74,78	12,72	6,870	-	88,95	34,60
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
rutin	P pika	729	399	4589	1763	3466	130	289	1234	79	64	431	469
	ng/mL	44,93	24,73	288,1	108,8	216,0	8,341	18,02	76,00	5,240	4,328	26,69	29,01
	mg/mL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

* površina pika za dato jedinjenje; ** koncentracija koja odgovara P pika (sa kalibracione krive); *** koncentracija ekstrakta korišćenog u analizi

8.4.1. PCA (eng. *principal components analysis*) rezultata kvantitativne analize odabranih fenolnih jedinjenja

Tabela 8.11. PCA rezultata LC-MS/MS kvantitativne analize odabranih fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima herbi svih ispitivanih vrsta – svojstvene vrednosti, procenat varijanse i opterećenja za 15 glavnih komponenata (Slika 4.22.).

	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5	PC 6	PC 7	PC 8	PC 9	PC 10	PC 11	PC 12	PC 13	PC 14	PC 15
Svojstvene vrednosti	49,78	22,71	0,851	0,171	0,063	0,013	0,007	0,006	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
% varijanse	67,63	30,86	1,156	0,232	0,086	0,018	0,010	0,008	0,002	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Opterećenja (loadings)														
p-OH-benzoeva k.	-0,001	0,000	-0,003	-0,006	0,004	-0,031	-0,042	-0,039	-0,132	0,488	0,175	0,670	0,427	-0,142	-0,217
protokatehinska k.	0,000	0,001	-0,008	0,000	0,004	-0,055	-0,006	-0,044	-0,424	0,517	0,517	-0,434	-0,146	0,004	0,143
2,5-dihidroksibenz.	0,000	0,000	0,000	0,004	0,005	-0,008	-0,004	-0,009	0,006	0,020	0,000	0,056	0,397	0,369	0,792
p-kumarinska k.	0,001	-0,003	-0,013	0,033	0,056	-0,034	-0,111	0,225	0,695	0,548	-0,211	-0,226	0,043	-0,132	0,085
galna k.	0,000	0,001	0,003	0,000	0,008	-0,005	-0,003	0,006	-0,009	-0,030	0,003	-0,055	0,028	-0,422	-0,001
eskuletin	0,000	0,000	0,001	-0,002	0,005	0,000	0,002	0,000	-0,004	-0,026	-0,100	-0,050	0,333	0,484	-0,271
kafena k.	0,021	0,000	-0,027	0,034	0,078	0,904	0,000	0,335	0,024	-0,067	0,218	-0,003	0,083	-0,033	-0,001
hinska kiselina	0,011	0,052	0,787	-0,273	-0,290	0,062	-0,459	0,018	-0,047	-0,002	-0,039	-0,011	-0,007	-0,009	0,017
skopoletin	0,002	-0,002	-0,005	0,014	0,043	-0,007	-0,110	0,048	0,247	0,124	0,310	0,309	-0,560	0,422	-0,040
ferulna k.	0,000	-0,001	-0,004	-0,002	0,026	-0,004	-0,072	0,034	0,100	0,046	0,003	0,032	-0,038	0,211	-0,180
katehin	-0,003	0,022	0,036	-0,155	0,180	-0,368	0,033	0,863	-0,145	-0,145	0,111	0,041	0,052	-0,007	-0,008
epikatehin	-0,027	0,122	0,479	0,141	0,808	-0,001	0,228	-0,173	0,031	0,000	0,014	-0,005	0,009	-0,006	-0,006
hlorogenska k.	0,935	-0,347	0,031	0,000	0,064	-0,020	-0,006	-0,012	-0,007	-0,002	-0,006	0,000	0,000	-0,002	0,000
viteksin	0,009	-0,033	0,246	-0,334	-0,311	0,024	0,780	0,005	0,161	0,088	0,106	-0,089	0,064	0,113	-0,127
apigenin-7-O-glukozid	0,000	0,000	0,001	0,001	-0,001	0,001	0,018	-0,003	-0,003	-0,040	-0,009	0,210	-0,232	0,161	0,084
luteolin-7-O-glukozid	0,002	-0,008	0,063	-0,085	-0,082	0,014	0,231	0,000	0,051	-0,040	-0,016	0,388	-0,274	-0,311	0,408
kemferol-3-O-glukozid	0,006	0,011	0,004	0,044	-0,044	-0,184	-0,120	-0,153	0,440	-0,373	0,691	-0,041	0,259	-0,132	-0,014
hiperozid	0,001	-0,002	0,014	-0,019	-0,017	0,001	0,044	0,000	0,009	0,005	0,006	-0,005	0,004	0,006	-0,007
kvercetin-3-O-glukozid	0,072	0,151	0,259	0,857	-0,331	-0,060	0,161	0,172	-0,032	0,008	0,003	0,017	-0,004	0,015	-0,012
rutin	0,346	0,915	-0,131	-0,154	-0,028	0,011	-0,004	-0,029	0,009	0,010	-0,010	-0,001	-0,005	0,002	0,001

Tabela 8.12. PCA rezultata LC-MS/MS kvantitativne analize odabranih fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima korena svih ispitivanih vrsta – svojstvene vrednosti, procenat varijanse i opterećenja za 15 glavnih komponenata (Slika 4.25.).

	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5	PC 6	PC 7	PC 8	PC 9	PC 10	PC 11	PC 12	PC 13	PC 14	PC 15
Svojstvene vrednosti	30,747	0,639	0,385	0,017	0,007	0,003	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
% varijanse	96,69	2,009	1,211	0,055	0,021	0,008	0,003	0,002	0,002	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Opterećenja (loadings)															
p-OH-benzoeva k.	0,000	-0,001	-0,009	0,007	0,010	0,004	0,126	0,196	0,820	-0,459	0,241	-0,003	0,041	0,055	-0,002
protokatehinska k.	0,002	0,012	0,005	0,066	0,017	-0,076	0,371	0,392	0,168	0,412	-0,147	0,392	-0,163	-0,540	0,079
hinska kiselina	0,053	0,924	-0,366	-0,073	-0,055	0,002	0,000	-0,009	0,010	0,021	0,005	-0,010	0,003	0,009	-0,003
siringinska k.	0,000	0,001	0,006	-0,028	0,084	-0,022	0,050	-0,158	0,076	0,148	-0,058	0,633	0,648	0,335	-0,028
p-kumarinska k.	-0,010	-0,013	-0,003	-0,373	0,389	0,698	0,403	-0,215	0,000	0,050	0,054	-0,070	-0,053	-0,023	0,003
ferulna k.	0,002	-0,009	0,003	-0,022	0,038	-0,033	0,150	0,234	0,230	0,253	-0,677	-0,345	-0,013	0,461	-0,112
kafena k.	0,002	0,005	0,046	0,032	0,128	0,050	-0,336	0,026	0,265	0,666	0,490	-0,060	-0,197	0,262	0,001
hlorogenska k.	0,267	0,346	0,896	0,029	0,049	0,007	0,004	0,007	-0,013	-0,047	-0,022	-0,004	0,008	-0,011	0,000
skopoletin	-0,006	-0,004	-0,012	-0,206	0,064	0,396	-0,509	0,671	-0,152	-0,158	-0,081	0,165	0,081	0,008	0,002
sekoizolaricirezinol	-0,008	0,000	-0,020	-0,461	0,667	-0,566	-0,061	0,063	-0,055	-0,084	0,020	-0,019	-0,037	-0,041	0,007
katehin	0,009	0,059	-0,091	0,721	0,600	0,143	-0,177	-0,089	0,038	-0,092	-0,165	0,008	0,000	-0,107	-0,006
epikatehin	0,962	-0,148	-0,228	-0,022	-0,007	0,002	-0,003	-0,003	0,003	0,009	0,005	0,003	-0,003	0,000	0,001
kvercetin-3-O-glukozid	0,003	0,016	-0,013	0,128	0,035	-0,034	0,247	0,117	-0,214	-0,210	0,088	0,430	-0,597	0,517	0,002
rutin	0,007	0,014	-0,021	0,237	0,089	-0,068	0,438	0,453	-0,311	0,032	0,413	-0,319	0,380	0,136	-0,028
amentoflavon	0,000	0,002	-0,001	0,007	0,005	0,002	0,000	0,002	0,009	0,000	-0,056	-0,063	0,042	0,107	0,990

Tabela 8.13. PCA rezultata LC-MS/MS kvantitativne analize odabranih fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima herbi vrsta iz roda *Urtica* – svojstvene vrednosti, procenat varijanse i opterećenja za 7 glavnih komponenata (Slika 4.23.).

	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5	PC 6	PC 7
Svojstvene vrednosti	48,28	9,827	0,326	0,089	0,014	0,005	0,000
% varijanse	82,47	16,79	0,557	0,152	0,024	0,009	0,001
Opterećenja (loadings)							
p-OH-benzoeva k.	0,000	0,001	-0,010	0,006	0,007	0,073	-0,012
protokatehinska k.	0,002	-0,002	-0,010	0,000	0,050	-0,012	0,397
2,5-dihidroksibenzoeva k.	0,000	0,000	-0,005	0,006	-0,019	-0,027	-0,025
p-kumarinska k.	-0,005	-0,006	-0,034	0,061	-0,058	0,266	-0,033
galna k.	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
eskuletin	0,000	0,001	-0,002	-0,004	-0,006	-0,036	-0,134
kafena k.	0,018	0,006	-0,109	0,100	0,906	0,134	0,196
hinska k.	0,008	0,193	0,805	-0,165	0,076	0,499	-0,115
skopoletin	0,000	0,000	-0,032	0,028	-0,053	0,233	0,279
ferulna k.	-0,001	0,000	-0,019	0,001	-0,018	0,097	-0,010
katehin	0,000	-0,001	-0,008	-0,012	-0,029	-0,095	-0,567
epikatehin	-0,001	0,009	0,033	-0,020	0,007	-0,054	0,019
hlorogenska k.	0,704	0,691	-0,157	0,036	-0,035	-0,011	-0,008
viteksin	-0,011	0,121	0,431	-0,262	0,090	-0,696	0,241
apigenin-7-O-glukozid	0,000	0,000	0,001	-0,001	0,000	-0,002	0,001
luteolin-7-O-glukozid	-0,003	0,031	0,112	-0,066	0,033	-0,180	0,048
kemferol-3-O-glukozid	0,011	-0,010	0,025	0,056	-0,390	0,175	0,557
hiperozid	-0,001	0,007	0,024	-0,015	0,005	-0,039	0,013
kvercetin-3-O-glukozid	0,121	-0,103	0,319	0,917	-0,022	-0,172	-0,017
rutin	0,700	-0,677	0,103	-0,200	0,021	0,019	0,001

Tabela 8.14. PCA rezultata LC-MS/MS kvantitativne analize odabranih fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima herbi vrsta iz roda *Parietaria* – svojstvene vrednosti, procenat varijanse i opterećenja za 7 glavnih komponenata (Slika 4.23.).

	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5	PC 6	PC 7
Svojstvene vrednosti	27,55	0,666	0,050	0,034	0,015	0,004	0,000
% varijanse	97,29	2,350	0,176	0,119	0,052	0,014	0,002
Opterećenja (loadings)							
p-OH-benzoeva k.	-0,001	-0,006	0,010	0,005	-0,061	-0,307	0,157
protokatehinska k.	-0,001	-0,003	0,044	-0,018	-0,116	-0,261	0,872
2,5-dihidroksibenzoeva k.	0,000	0,002	0,000	0,004	0,003	-0,036	-0,002
p-kumarinska k.	0,001	-0,008	-0,016	0,022	-0,003	-0,091	-0,049
galna k.	0,001	0,003	0,014	-0,004	0,002	0,015	-0,011
eskuletin	0,000	0,000	0,002	0,006	0,007	0,005	0,008
kafena k.	0,008	-0,023	-0,254	0,010	0,651	0,584	0,278
hinska k.	0,136	0,506	0,284	0,716	-0,013	0,188	0,091
ferulna k.	0,000	-0,005	0,015	0,018	0,002	0,010	-0,007
katehin	0,033	-0,077	0,362	-0,069	-0,564	0,536	0,043
epikatehin	0,169	0,510	0,484	-0,635	0,237	0,005	0,017
hlorogenska k.	0,008	-0,009	0,368	0,269	0,370	-0,392	-0,176

	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5	PC 6	PC 7
Svojtvene vrednosti	27,55	0,666	0,050	0,034	0,015	0,004	0,000
% varijanse	97,29	2,350	0,176	0,119	0,052	0,014	0,002
Opterećenja (loadings)							
apigenin-7-O-glukozid	0,000	0,001	-0,009	-0,014	-0,010	0,015	-0,112
luteolin-7-O-glukozid	0,000	0,000	-0,013	-0,022	-0,004	0,016	-0,267
kemferol-3-O-glukozid	0,011	0,025	0,001	0,030	0,008	0,007	-0,069
kvercetin-3-O-glukozid	0,176	0,632	-0,591	-0,057	-0,217	-0,092	-0,068
amentoflavon	0,000	-0,003	0,009	-0,001	-0,009	0,010	-0,001
rutin	0,959	-0,275	-0,031	0,021	0,011	-0,032	-0,004

8.5. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA I FLAVONOIDA

Tabela 8.15. Podaci za konstrukciju kalibracione krive standardnog rastvora galne kiseline.

C_{radna} [$\mu\text{g/mL}$]	A (760 nm)			A_{srednje}	$A_{\text{korekcija}}$	$A_{\text{sr}}-A_{\text{kor}}$
11,04	0,757	0,777	0,784	0,772	0,053	0,720
9,036	0,644	0,677	0,678	0,666	0,054	0,613
7,028	0,523	0,651	0,567	0,550	0,055	0,495
4,518	0,376	0,391	0,391	0,386	0,051	0,335
3,514	0,310	0,22	0,322	0,318	0,052	0,266
2,259	0,228	0,240	0,239	0,236	0,052	0,184
1,130	0,157	0,162	0,161	0,160	0,053	0,107
0,565	0,141	0,128	0,123	0,131	0,050	0,081
0,283	0,110	0,110	0,107	0,109	0,057	0,052
0,141	0,100	0,093	0,091	0,095	0,054	0,041

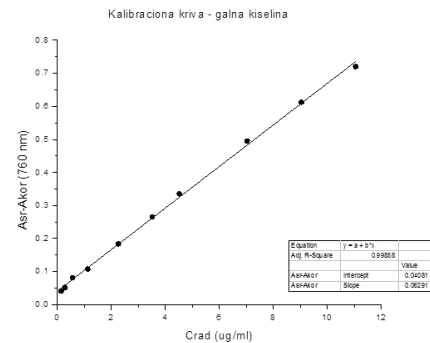


Tabela 8.16. Očitane apsorbancije za tri koncentracije ispitivanih ekstrakata i rezultati određenih ukupnih fenolnih jedinjenja izraženih kao mg ekvivalenata galne kiseline po 1g suvog ekstrakta (mg eqGA/1g SE).

	Herba			Koren			List			
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	
<i>U. dio1 (pub)</i>	C_{radna} ($\mu\text{g/ml}$)	160	80	40	160	80	40	160	80	40
	A_{srednje}	0,578	0,342	0,221	0,430	0,272	0,181	0,790	0,481	0,298
	$A_{\text{korekcija}}$	0,055	0,051	0,052	0,052	0,048	0,050	0,050	0,050	0,047
	$A_{\text{sr}}-A_{\text{kor}}$	0,523	0,291	0,169	0,378	0,224	0,131	0,740	0,431	0,251
	$\mu\text{g/mL}$ GA sa kal, k,	7,666	3,982	2,033	5,3550	2,91	1,429		6,201	3,344
	mg eqGA/1g SE	47,91	49,78	50,83	33,47	36,38	35,73		77,51	83,60
		49,50 \pm 1,47			35,19 \pm 1,53			80,56 \pm 4,30		
<i>U. dio3 (pub)</i>	C_{radna} ($\mu\text{g/ml}$)	100	50	25	100	50	25			
	A_{srednje}	0,577	0,343	0,213	0,284	0,183	0,127			
	$A_{\text{korekcija}}$	0,048	0,044	0,044	0,051	0,045	0,044			
	$A_{\text{sr}}-A_{\text{kor}}$	0,529	0,299	0,169	0,233	0,138	0,083			
	$\mu\text{g/mL}$ GA sa kal, k,	8,054	4,267	2,127	3,180	1,616	0,71			
	mg eqGA/1g SE	80,54	85,34	85,08	31,80	32,32	28,40			
		83,65 \pm 2,70			30,84 \pm 2,13					
<i>U. dio4 (pub)</i>	C_{radna} ($\mu\text{g/ml}$)	160	80	40	160	80	40	160	80	40
	A_{srednje}	0,649	0,388	0,254	0,466	0,293	0,225	0,513	0,312	0,200
	$A_{\text{korekcija}}$	0,050	0,049	0,049	0,051	0,050	0,049	0,057	0,051	0,048
	$A_{\text{sr}}-A_{\text{kor}}$	0,599	0,339	0,206	0,415	0,243	0,176	0,456	0,261	0,151
	$\mu\text{g/mL}$ GA sa kal, k,	8,868	4,737	2,623	5,942	3,211	2,146	6,601	3,506	1,758
	mg eqGA/1g SE	55,43	59,21	65,58	37,14	40,14	53,65	41,26	43,83	43,95
		60,07 \pm 5,13			43,64 \pm 8,80			43,01 \pm 1,52		

		Herba			Koren			List		
		C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
<i>U. dio5 (dio)</i>	C_{radna} ($\mu\text{g/ml}$)	160	80	40	160	80	40	160	80	40
	$A_{srednje}$	0,883	0,535	0,551	0,460	0,284	0,186	1,064	0,669	0,404
	$A_{korekcija}$	0,051	0,052	0,053	0,101	0,101	0,050	0,051	0,050	0,048
	$A_{sr}-A_{kor}$	0,832	0,483	0,498	0,359	0,182	0,136	1,013	0,619	0,356
	$\mu\text{g/mL GA sa kal, k,}$	12,575	7,032		5,0550	2,249	1,511		9,192	5,015
	mg eqGA/1g SE	78,59	87,90		31,59	28,11	37,78		114,9	125,4
		83,25 \pm 6,58			32,49 \pm 4,89			120,1 \pm 7,4		
<i>U. dio6 (pub)</i>	C_{radna} ($\mu\text{g/ml}$)	100	50	25	100	50	25	100	50	25
	$A_{srednje}$	0,678	0,402	0,255	0,272	0,187	0,142	0,757	0,460	0,282
	$A_{korekcija}$	0,049	0,046	0,048	0,048	0,047	0,046	0,050	0,057	0,045
	$A_{sr}-A_{kor}$	0,629	0,356	0,206	0,223	0,139	0,095	0,707	0,403	0,237
	$\mu\text{g/mL GA sa kal, k,}$	9,700	5,205	2,736	3,016	1,633	0,908		5,979	3,246
	mg eqGA/1g SE	97,00	104,10	109,44	30,16	32,66	36,32		119,58	129,84
		103,51 \pm 6,24			33,05 \pm 3,10			124,7 \pm 7,3		
<i>U. dio7 (dio)</i>	C_{radna} ($\mu\text{g/ml}$)	100	50	25	100	50	25	100	50	25
	$A_{srednje}$	0,560	0,358	0,214	0,256	0,165	0,118	0,475	0,286	0,188
	$A_{korekcija}$	0,052	0,059	0,047	0,048	0,046	0,047	0,049	0,047	0,046
	$A_{sr}-A_{kor}$	0,508	0,299	0,166	0,208	0,119	0,071	0,426	0,239	0,142
	$\mu\text{g/mL GA sa kal, k,}$	7,708	4,267	2,077	2,769	1,303	0,513	6,358	3,279	1,682
	mg eqGA/1g SE	77,08	85,34	83,08	27,69	26,06	20,52	63,58	65,58	67,28
		81,83 \pm 4,27			24,76 \pm 3,76			65,48 \pm 1,85		
<i>U. dio8 (pub)</i>	C_{radna} ($\mu\text{g/ml}$)	100	50	25	100	50	25	100	50	25
	$A_{srednje}$	0,626	0,379	0,235	0,281	0,183	0,125	0,804	0,466	0,283
	$A_{korekcija}$	0,051	0,046	0,049	0,049	0,049	0,048	0,049	0,045	0,043
	$A_{sr}-A_{kor}$	0,575	0,333	0,186	0,231	0,133	0,077	0,755	0,421	0,239
	$\mu\text{g/mL GA sa kal, k,}$	8,806	4,828	2,408	3,1550	1,539	0,614		6,269	3,285
	mg eqGA/1g SE	88,06	96,56	96,32	31,55	30,78	24,56		125,38	131,40
		93,65 \pm 4,84			28,96 \pm 3,83			128,4 \pm 4,3		
<i>U. kioviensis</i>	C_{radna} ($\mu\text{g/ml}$)	100	50	25	100	50	25	100	50	25
	$A_{srednje}$	1,213	0,751	0,475	0,312	0,229	0,152	1,167	0,792	0,499
	$A_{korekcija}$	0,051	0,050	0,051	0,051	0,053	0,051	0,050	0,050	0,056
	$A_{sr}-A_{kor}$	1,162	0,702	0,423	0,261	0,176	0,101	1,117	0,741	0,443
	$\mu\text{g/mL GA sa kal, k,}$		10,90	6,310	3,640	2,240	1,010		11,54	6,640
	mg eqGA/1g SE		218,1	252,4	36,41	44,84	40,28		230,9	265,5
		235,2 \pm 24,3			40,51 \pm 4,22			248,2 \pm 24,5		
<i>P. judaica1</i>	C_{radna} ($\mu\text{g/ml}$)	100	50	25	50	25	12,5	100	50	25
	$A_{srednje}$	0,680	0,405	0,252	0,917	0,548	0,342	0,695	0,407	0,246
	$A_{korekcija}$	0,045	0,044	0,046	0,049	0,047	0,047	0,048	0,047	0,047
	$A_{sr}-A_{kor}$	0,635	0,361	0,206	0,868	0,501	0,295	0,647	0,360	0,199
	$\mu\text{g/mL GA sa kal, k,}$	9,799	5,288	2,736		7,593	4,201	9,997	5,271	2,62
	mg eqGA/1g SE	97,99	105,76	109,44		303,72	336,08	99,97	105,42	104,80
		104,4 \pm 5,9			319,9 \pm 22,9			103,4 \pm 3,0		
<i>P. judaica2</i>	C_{radna} ($\mu\text{g/ml}$)	100	50	25	50	25	12,5	100	50	25
	$A_{srednje}$	0,655	0,393	0,234	0,799	0,477	0,302	0,537	0,324	0,208
	$A_{korekcija}$	0,045	0,043	0,046	0,062	0,049	0,047	0,054	0,049	0,050
	$A_{sr}-A_{kor}$	0,609	0,350	0,188	0,736	0,428	0,254	0,483	0,275	0,158
	$\mu\text{g/mL GA sa kal, k,}$	9,377	5,106	2,435		6,399	3,532	7,300	3,872	1,945
	mg eqGA/1g SE	93,77	102,12	97,40		255,96	282,56	73,00	77,44	77,80
		97,76 \pm 4,19			269,3 \pm 18,8			76,08 \pm 2,67		

		Herba			Koren			List		
		C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
<i>P. serbica</i> - herba										
<i>P. officinalis</i> 1	C _{radna} (µg/ml)	160	80	40	80	20	10	100	50	25
	A _{srednje}	0,610	0,372	0,243	0,676	0,243	0,155	0,200	0,133	0,098
	A _{korekcija}	0,049	0,055	0,056	0,053	0,051	0,051	0,045	0,048	0,046
	A _{sr} -A _{kor}	0,561	0,317	0,187	0,623	0,191	0,104	0,155	0,085	0,052
	µg/mL GA sa kal, k,	8,264	4,388	2,32	9,2590	2,391	1,009	1,896	0,743	
	mg eqGA/1g SE	51,65	54,85	58	115,7	119,6	100,9	18,96	14,86	
		54,83 ± 3,18			112,2 ± 9,9			16,91 ± 2,90		
<i>P. officinalis</i> 2	C _{radna} (µg/ml)	160	80	40	20	10	5	160	80	40
	A _{srednje}	0,562	0,346	0,214	0,592	0,363	0,226	0,384	0,246	0,162
	A _{korekcija}	0,065	0,059	0,064	0,053	0,050	0,059	0,050	0,051	0,050
	A _{sr} -A _{kor}	0,497	0,287	0,150	0,539	0,314	0,166	0,334	0,195	0,112
	µg/mL GA sa kal, k,	7,248	3,905	1,736	7,9240	4,338	1,996	4,6540	2,445	1,132
	mg eqGA/1g SE	45,30	48,81	43,40	396,20	433,80	399,20	29,09	30,56	28,30
		45,84 ± 2,75			409,7 ± 20,9			29,32 ± 1,15		
<i>P. officinalis</i> 3	C _{radna} (µg/ml)	160	80	40	160	80	40	160	80	40
	A _{srednje}	0,474	0,289	0,182	0,900	0,571	0,344	0,763	0,459	0,291
	A _{korekcija}	0,054	0,050	0,049	0,051	0,049	0,050	0,049	0,047	0,048
	A _{sr} -A _{kor}	0,421	0,239	0,133	0,849	0,522	0,294	0,714	0,412	0,243
	µg/mL GA sa kal, k,	6,035	3,144	1,467		7,649	4,029	10,7100	5,899	3,217
	mg eqGA/1g SE	37,72	39,30	36,68		95,61	100,7	66,94	73,74	80,43
		37,90 ± 1,32			98,17 ± 3,62			77,32 ± 6,74		
<i>P. officinalis</i> 4	C _{radna} (µg/ml)	160	80	40	40	20	10	160	80	40
	A _{srednje}	0,665	0,411	0,425	0,552	0,332	0,215	0,659	0,409	0,262
	A _{korekcija}	0,051	0,052	0,062	0,051	0,061	0,048	0,059	0,056	0,050
	A _{sr} -A _{kor}	0,614	0,360	0,363	0,501	0,271	0,167	0,600	0,353	0,212
	µg/mL GA sa kal, k,	9,119	5,067		7,3130	3,664	2,012	8,8820	4,956	2,716
	mg eqGA/1g SE	56,99	63,34		182,8	183,2	201,2	55,51	61,95	67,90
		60,17 ± 4,49			193,6 ± 10,5			72,29 ± 6,20		
<i>P. lusitanica</i> 1	C _{radna} (µg/ml)	100	50	25	50	25	12,5	100	50	25
	A _{srednje}	0,524	0,311	0,208	0,850	0,528	0,316	0,527	0,335	0,216
	A _{korekcija}	0,048	0,048	0,047	0,051	0,047	0,047	0,049	0,049	0,051
	A _{sr} -A _{kor}	0,476	0,263	0,161	0,799	0,481	0,269	0,478	0,286	0,166
	µg/mL GA sa kal, k,	7,181	3,674	1,995		7,263	3,773	7,214	4,053	2,077
	mg eqGA/1g SE	71,81	73,48	79,80		290,5	301,8	72,14	81,06	83,08
		75,03 ± 4,21			296,2 ± 8,0			78,76 ± 5,82		
<i>P. lusitanica</i> 2	C _{radna} (µg/ml)	100	50	25	50	25	12,5	100	50	25
	A _{srednje}	0,163	0,119	0,099	0,396	0,249	0,170	0,173	0,129	0,096
	A _{korekcija}	0,050	0,046	0,048	0,047	0,048	0,047	0,049	0,047	0,046
	A _{sr} -A _{kor}	0,113	0,073	0,052	0,349	0,201	0,123	0,124	0,082	0,050
	µg/mL GA sa kal, k,	1,204	0,546	0,2	5,090	2,653	1,369	1,386	0,694	0,167
	mg eqGA/1g SE	12,04	10,92	8,00	101,8	106,1	109,5	13,86	13,88	6,68
		10,32 ± 2,09			105,8 ± 3,9			13,87 ± 0,01		
Infuzi – vodeni ekstrakti										
		HERBA			KOREN			LIST		
		C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
<i>U. dio</i> 1 (pub)	C _{radna} (µg/ml)	125	62,5	31,25	125	62,5	31,25	125	62,5	31,25
	A _{srednje}	0,605	0,357	0,223	0,312	0,200	0,137	0,922	0,562	0,346
	A _{korekcija}	0,054	0,050	0,048	0,049	0,047	0,047	0,059	0,056	0,051
	A _{sr} -A _{kor}	0,552	0,307	0,176	0,264	0,153	0,090	0,863	0,506	0,296
	µg/mL GA sa kal, k,	8,155	4,280	2,209	3,600	1,845	0,849		7,427	4,106
	mg eqGA/1g SE	65,24	68,48	70,69	28,80	29,52	27,17		118,8	131,4
		68,14 ± 2,74			28,50 ± 1,21			125,1 ± 8,9		

		Herba			Koren			List		
		C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
<i>P. judaica</i>	C_{radna} ($\mu\text{g/ml}$)	125	62,5	31,25	125	62,5	31,25	125	62,5	31,25
	$A_{srednje}$	0,871	0,520	0,307	1,006	0,613	0,381	0,875	0,531	0,324
	$A_{korekcija}$	0,052	0,048	0,046	0,051	0,051	0,050	0,055	0,056	0,050
	$A_{sr}-A_{kor}$	0,819	0,472	0,261	0,955	0,562	0,331	0,820	0,476	0,274
	$\mu\text{g/mL GA sa kal, k,}$		6,889	3,553		8,313	4,660		6,953	3,758
	mg eqGA/1g SE		110,2	113,7		133,0	149,1		111,2	120,3
		112,0 \pm 2,46			141,1 \pm 11,4			115,8 \pm 6,4		
<i>P. officinalis</i>	C_{radna} ($\mu\text{g/ml}$)	125	62,5	31,25				125	62,5	31,25
	$A_{srednje}$	0,581	0,350	0,216				0,377	0,235	0,158
	$A_{korekcija}$	0,054	0,048	0,050				0,056	0,051	0,049
	$A_{sr}-A_{kor}$	0,528	0,303	0,166				0,321	0,185	0,109
	$\mu\text{g/mL GA sa kal, k,}$	7,775	4,217	2,051				4,502	2,351	1,149
	mg eqGA/1g SE	62,20	67,47	65,63				36,02	37,62	36,77
		65,10 \pm 2,68						36,80 \pm 0,80		
<i>P. lusitanica</i>	C_{radna} ($\mu\text{g/ml}$)	125	62,5	31,25				125	62,5	31,25
	$A_{srednje}$	0,592	0,358	0,224				0,673	0,410	0,253
	$A_{korekcija}$	0,057	0,049	0,049				0,058	0,050	0,049
	$A_{sr}-A_{kor}$	0,535	0,309	0,175				0,614	0,360	0,204
	$\mu\text{g/mL GA sa kal, k,}$	7,886	4,312	2,193				9,135	5,118	2,651
	mg eqGA/1g SE	63,09	68,99	70,18				73,08	81,89	84,83
		67,42 \pm 3,80						79,93 \pm 6,11		

Tabela 8.17. Podaci za konstrukciju kalibracione krive standardnog rastvora kvercetina.

C_{radna} [$\mu\text{g/mL}$]	A (760 nm)			$A_{srednje}$	$A_{korekcija}$	$A_{sr}-A_{kor}$
12,29	0,948	0,959	0,964	0,957	0,238	0,719
10,37	0,767	0,774	0,802	0,781	0,201	0,580
8,068	0,619	0,639	0,640	0,632	0,171	0,461
6,147	0,484	0,501	0,498	0,494	0,145	0,349
4,610	0,364	0,378	0,385	0,376	0,113	0,263
3,458	0,293	0,297	0,303	0,298	0,103	0,194
1,729	0,173	0,176	0,175	0,175	0,079	0,096
0,864	0,109	0,114	0,112	0,112	0,059	0,053
0,432	0,079	0,079	0,079	0,079	0,052	0,027
0,216	0,062	0,063	0,065	0,063	0,050	0,013

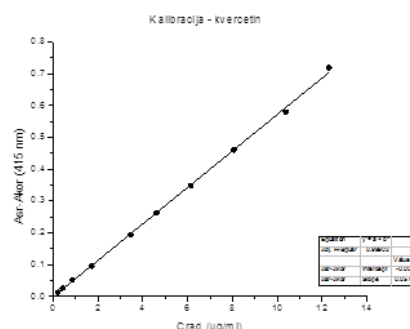


Tabela 8.18. Očitane apsorbancije za tri koncentracije ispitivanih ekstrakata i rezultati određenih ukupnih flavonoida izraženih kao mg ekvivalenata kvercetina po 1g suvog ekstrakta (mg eqQ/1g SE).

		Herba			Koren			List		
		C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
<i>U. dio1 (pub)</i>	C_{radna} ($\mu\text{g/ml}$)	400	40	4	400	40	4	400	40	4
	$A_{srednje}$	0,212	0,069	0,075	0,108	0,055	0,051	0,259	0,076	0,055
	$A_{korekcija}$	0,137	0,060	0,055	0,079	0,054	0,055	0,151	0,063	0,052
	$A_{sr}-A_{kor}$	0,076	0,010	0,020	0,028	0,000	-0,004	0,108	0,013	0,003
	$\mu\text{g/mL Q sa kal, k,}$	1,334			0,508			1,900		
	mg eqQ/1g SE	3,335			1,269			4,751		
		3,335 \pm 0,000			1,269 \pm 0,000			4,751 \pm 0,000		
<i>U. dio3 (pub)</i>	C_{radna} ($\mu\text{g/ml}$)	800	400	200	800	400	200			
	$A_{srednje}$	0,619	0,350	0,191	0,194	0,108	0,071			
	$A_{korekcija}$	0,227	0,136	0,092	0,093	0,059	0,053			
	$A_{sr}-A_{kor}$	0,392	0,214	0,099	0,101	0,050	0,018			
	$\mu\text{g/mL Q sa kal, k,}$	7,696	4,202	1,944	1,983	0,982	0,353			
	mg eqQ/1g SE	9,62	10,51	9,72	2,48	2,46	1,77			
		9,95 \pm 0,48			2,23 \pm 0,41					

	Herba			Koren			List			
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	
<i>U. dio4 (pub)</i>	C _{radna} (µg/ml)	400	40	4	400	40	4	400	40	4
	A _{srednje}	0,176	0,066	0,054	0,092	0,054	0,053	0,165	0,060	0,049
	A _{korekcija}	0,109	0,060	0,051	0,074	0,053	0,055	0,118	0,056	0,048
	A _{sr} -A _{kor}	0,067	0,006	0,002	0,018	0,001	0,002	0,047	0,004	0,001
	µg/mL Q sa kal, k,	1,191			0,328			0,830		
	mg eqQ/1g SE	2,977			0,820			2,075		
	2,977 ± 0,000			0,820 ± 0,000			2,075 ± 0,000			
<i>U. dio5 (dio)</i>	C _{radna} (µg/ml)	400	40	4	400	40	4	400	40	4
	A _{srednje}	0,336	0,078	0,053	0,119	0,053	0,048	0,382	0,091	0,054
	A _{korekcija}	0,137	0,058	0,047	0,068	0,051	0,046	0,171	0,066	0,050
	A _{sr} -A _{kor}	0,199	0,020	0,006	0,051	0,002	0,001	0,211	0,025	0,004
	µg/mL Q sa kal, k,	3,488	0,372		0,900			3,698	0,450	
	mg eqQ/1g SE	8,721	9,292		2,250			9,244	11,253	
	9,007 ± 0,404			2,250 ± 0,000			10,249 ± 1,421			
<i>U. dio6 (pub)</i>	C _{radna} (µg/ml)	800	400	200	800	400	200	800	400	200
	A _{srednje}	0,892	0,462	0,261	0,126	0,073	0,061	0,825	0,437	0,241
	A _{korekcija}	0,245	0,158	0,104	0,073	0,055	0,049	0,240	0,146	0,096
	A _{sr} -A _{kor}	0,647	0,304	0,157	0,053	0,019	0,013	0,586	0,291	0,146
	µg/mL Q sa kal, k,		5,969	3,083	1,041	0,373	0,255	11,51	5,713	2,867
	mg eqQ/1g SE		14,92	15,42	1,30	0,93	1,28	14,39	14,28	14,34
	15,17 ± 0,35			1,17 ± 0,21			14,34 ± 0,05			
<i>U. dio7 (dio)</i>	C _{radna} (µg/ml)	800	400	200	800	400	200	800	400	200
	A _{srednje}	0,573	0,346	0,171	0,150	0,080	0,060	0,375	0,214	0,127
	A _{korekcija}	0,214	0,154	0,089	0,080	0,058	0,051	0,185	0,118	0,079
	A _{sr} -A _{kor}	0,359	0,191	0,082	0,070	0,022	0,010	0,190	0,096	0,048
	µg/mL Q sa kal, k,	7,049	3,75	1,61	1,374	0,432	0,196	3,730	1,885	0,942
	mg eqQ/1g SE	8,81	9,38	8,05	1,72	1,08	0,98	4,66	4,71	4,71
	8,75 ± 0,66			1,26 ± 0,40			4,70 ± 0,03			
<i>U. dio8 (pub)</i>	C _{radna} (µg/ml)	800	400	200	800	400	200	800	400	200
	A _{srednje}	0,336	0,181	0,114	0,114	0,071	0,052	0,409	0,213	0,132
	A _{korekcija}	0,158	0,107	0,079	0,075	0,057	0,049	0,188	0,109	0,085
	A _{sr} -A _{kor}	0,178	0,074	0,035	0,039	0,014	0,003	0,221	0,105	0,047
	µg/mL Q sa kal, k,	3,495	1,453	0,687	0,766	0,275	0,059	4,3390	2,061	0,923
	mg eqQ/1g SE	4,37	3,63	3,44	0,96	0,69	0,30	5,42	5,15	4,62
	3,81 ± 0,49			0,65 ± 0,33			5,06 ± 0,41			
<i>U. kioviensis</i>	C _{radna} (µg/ml)	800	400	200	800	400	200	800	400	200
	A _{srednje}	2,630	1,544	0,836	0,516	0,285	0,183	2,745	1,657	0,954
	A _{korekcija}	1,099	1,125	0,627	0,383	0,235	0,163	1,036	1,094	0,610
	A _{sr} -A _{kor}	1,531	0,419	0,209	0,133	0,051	0,020	1,709	0,562	0,344
	µg/mL Q sa kal, k,		8,23	4,10	2,61	1,00	0,39		11,03	6,75
	mg eqQ/1g SE		20,57	20,52	3,26	2,50	1,96		27,59	33,77
	20,54 ± 0,03			2,58 ± 0,65			30,68 ± 4,37			
<i>P. judaica1</i>	C _{radna} (µg/ml)	800	400	200	800	400	200	800	400	200
	A _{srednje}	0,628	0,318	0,186	0,226	0,128	0,080	0,861	0,455	0,257
	A _{korekcija}	0,163	0,111	0,080	0,154	0,088	0,080	0,218	0,133	0,090
	A _{sr} -A _{kor}	0,465	0,207	0,106	0,072	0,041	0,001	0,643	0,322	0,167
	µg/mL Q sa kal, k,	9,130	4,064	2,081	1,414	0,805	0,020	12,624	6,322	3,279
	mg eqQ/1g SE	11,41	10,16	10,41	1,77	2,01		15,78	15,81	16,40
	10,66 ± 0,66			1,89 ± 0,17			15,99 ± 0,35			
<i>P. judaica2</i>	C _{radna} (µg/ml)	800	400	200	800	400	200	800	400	200
	A _{srednje}	0,704	0,367	0,199	0,157	0,084	0,062	0,393	0,223	0,134
	A _{korekcija}	0,181	0,115	0,082	0,075	0,055	0,047	0,183	0,111	0,078
	A _{sr} -A _{kor}	0,523	0,252	0,117	0,082	0,029	0,015	0,210	0,113	0,055
	µg/mL Q sa kal, k,		4,948	2,3	1,610	0,569	0,294	4,123	2,219	1,08
	mg eqQ/1g SE		12,37	11,50	2,01	1,42	1,47	5,15	5,55	5,40

	Herba			Koren			List			
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	
	11,94 ± 0,62			1,64 ± 0,33			5,37 ± 0,20			
<i>P. officinalis1</i>	C _{radna} (µg/ml)	400	40	4	400	40	4			
	A _{srednje}	0,203	0,064	0,048	0,113	0,054	0,054			
	A _{korekcija}	0,095	0,052	0,046	0,066	0,053	0,047			
	A _{sr-Akor}	0,109	0,012	0,002	0,047	0,001	0,007			
	µg/mL Q sa kal, k,	1,911	0,230		0,842					
	mg eqQ/1g SE	4,777	5,761		2,106					
	5,269 ± 0,695			2,106 ± 0,000						
<i>P. officinalis2</i>	C _{radna} (µg/ml)	400	40	4	400	40	4	400	40	4
	A _{srednje}	0,212	0,066	0,050	0,098	0,053	0,046	0,117	0,054	0,049
	A _{korekcija}	0,103	0,054	0,048	0,084	0,055	0,047	0,087	0,051	0,047
	A _{sr-Akor}	0,110	0,013	0,001	0,013	-0,002	-0,001	0,030	0,003	0,002
	µg/mL Q sa kal, k,	1,930	0,243		0,246			0,541		
	mg eqQ/1g SE	4,825	6,067		0,615			1,352		
	5,446 ± 0,878			0,615 ± 0,000			1,352 ± 0,000			
<i>P. officinalis3</i>	C _{radna} (µg/ml)	400	40	4	400	40	4	400	40	4
	A _{srednje}	0,199	0,061	0,048	0,098	0,049	0,048	0,273	0,073	0,049
	A _{korekcija}	0,095	0,053	0,046	0,068	0,047	0,047	0,099	0,050	0,047
	A _{sr-Akor}	0,103	0,008	0,002	0,030	0,002	0,001	0,174	0,023	0,003
	µg/mL Q sa kal, k,	1,820			0,536			3,060	0,427	
	mg eqQ/1g SE	4,551			1,339			7,649	10,686	
	4,551 ± 0,000			1,339 ± 0,000			9,168 ± 2,148			
<i>P. officinalis4</i>	C _{radna} (µg/ml)	400	40	4	400	40	4	400	40	4
	A _{srednje}	0,239	0,069	0,051	0,114	0,056	0,048	0,232	0,069	0,050
	A _{korekcija}	0,099	0,052	0,047	0,082	0,052	0,047	0,118	0,056	0,048
	A _{sr-Akor}	0,140	0,017	0,004	0,032	0,004	0,001	0,114	0,013	0,002
	µg/mL Q sa kal, k,	2,453	0,309		0,572			2,008	0,246	
	mg eqQ/1g SE	6,132	7,722		1,430			5,021	6,154	
	6,927 ± 1,124			1,430 ± 0,000			5,588 ± 0,801			
<i>P. lusitanica1</i>	C _{radna} (µg/ml)	800	400	200	800	400	200	800	400	200
	A _{srednje}	0,279	0,163	0,107	0,162	0,096	0,068	0,278	0,160	0,096
	A _{korekcija}	0,116	0,080	0,060	0,115	0,077	0,062	0,118	0,076	0,058
	A _{sr-Akor}	0,162	0,084	0,047	0,047	0,019	0,006	0,160	0,084	0,038
	µg/mL Q sa kal, k,	3,181	1,65	0,923	0,923	0,373	0,118	3,141	1,649	0,746
	mg eqQ/1g SE	3,98	4,13	4,62	1,15	0,93	0,59	3,93	4,12	3,73
	4,24 ± 0,33			0,89 ± 0,28			3,93 ± 0,20			
<i>P. lusitanica2</i>	C _{radna} (µg/ml)	800	400	200	800	400	200	800	400	200
	A _{srednje}	0,078	0,066	0,055	0,186	0,104	0,075	0,601	0,333	0,190
	A _{korekcija}	0,063	0,050	0,046	0,097	0,074	0,053	0,308	0,167	0,103
	A _{sr-Akor}	0,015	0,016	0,009	0,089	0,031	0,022	0,294	0,167	0,087
	µg/mL Q sa kal, k,	0,295	0,314	0,177	1,747	0,609	0,432	5,772	3,279	1,708
	mg eqQ/1g SE	0,37	0,79	0,89	2,18	1,52	2,16	7,22	8,20	8,54
	0,84 ± 0,07			2,17 ± 0,02			8,37 ± 0,24			

Infuzi – vodeni ekstrakti

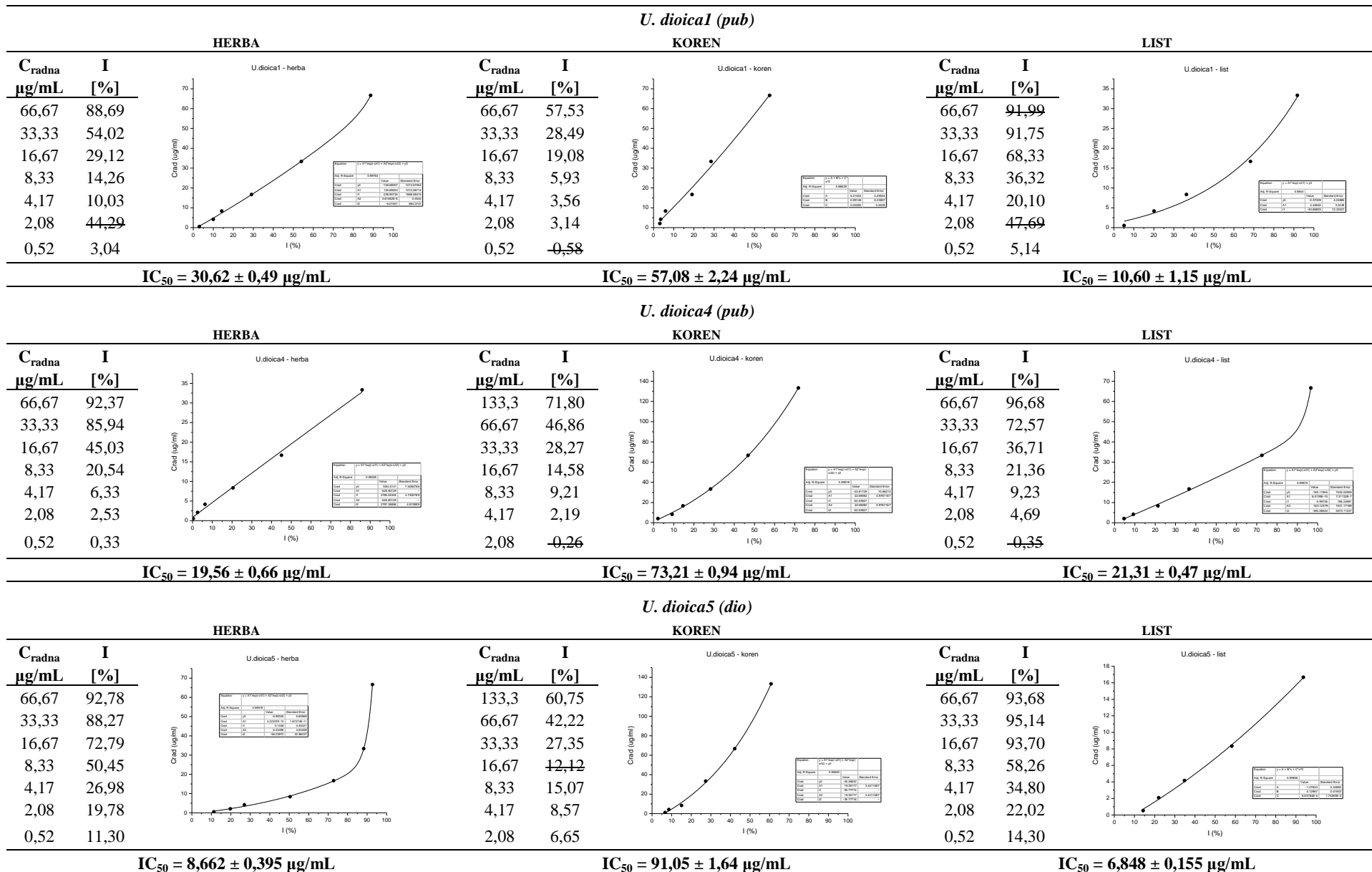
	HERBA			KOREN			LIST			
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	
<i>U. dio1(pub)</i>	C _{radna} (µg/ml)	1000	500	250	1000	500	250	1000	500	250
	A _{srednje}	0,748	0,389	0,211	0,186	0,117	0,080	1,404	0,624	0,337
	A _{korekcija}	0,605	0,280	0,154	0,147	0,098	0,075	1,011	0,477	0,248
	A _{sr-Akor}	0,143	0,109	0,058	0,039	0,019	0,005	0,393	0,147	0,089
	µg/mL Q sa kal, k,	2,634	2,011	1,078	0,730	0,363	0,107	7,211	20707	1,645
	mg eqQ/1g SE	2,634	4,022	4,312	0,730	0,726	0,428	7,211	5,414	6,580
	4,167 ± 0,205			0,728 ± 0,003			6,402 ± 0,912			

		Herba			Koren			List		
		C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
<i>P. judaical</i>	C_{radna} ($\mu\text{g/ml}$)	1000	500	250	1000	500	250	1000	500	250
	$A_{srednje}$	1,135	0,600	0,289	0,163	0,105	0,075	1,299	0,758	0,380
	$A_{korekcija}$	0,600	0,306	0,161	0,122	0,081	0,065	0,937	0,428	0,215
	$A_{sr}-A_{kor}$	0,534	0,295	0,128	0,041	0,024	0,009	0,362	0,329	0,165
	$\mu\text{g/mL Q sa kal, k,}$	9,793	5,417	2,359	0,766	0,455	0,180	6,644	6,039	3,037
	mg eqQ/1g SE	9,793	10,83	9,436	0,766	0,910	0,720	6,644	12,08	12,15
			10,02 \pm 0,73			0,799 \pm 0,099			12,11 \pm 0,05	
<i>P. officinalis2</i>	C_{radna} ($\mu\text{g/ml}$)	1000	500	250				1000	500	250
	$A_{srednje}$	0,573	0,296	0,185				0,347	0,186	0,119
	$A_{korekcija}$	0,351	0,198	0,120				0,279	0,152	0,101
	$A_{sr}-A_{kor}$	0,222	0,098	0,065				0,068	0,035	0,018
	$\mu\text{g/mL Q sa kal, k,}$	4,080	1,810	1,206				1,261	0,656	0,345
	mg eqQ/1g SE	4,080	3,620	4,824				1,261	1,312	1,380
			4,175 \pm 0,608						1,318 \pm 0,060	
<i>P. lusitanical</i>	C_{radna} ($\mu\text{g/ml}$)	1000	500	250				1000	500	250
	$A_{srednje}$	0,698	0,357	0,194				0,843	0,452	0,233
	$A_{korekcija}$	0,421	0,216	0,125				0,655	0,323	0,174
	$A_{sr}-A_{kor}$	0,276	0,141	0,069				0,188	0,129	0,059
	$\mu\text{g/mL Q sa kal, k,}$	5,069	2,600	1,279				3,458	2,377	1,096
	mg eqQ/1g SE	5,069	5,200	5,116				3,458	4,754	4,384
			5,128 \pm 0,066						4,199 \pm 0,668	

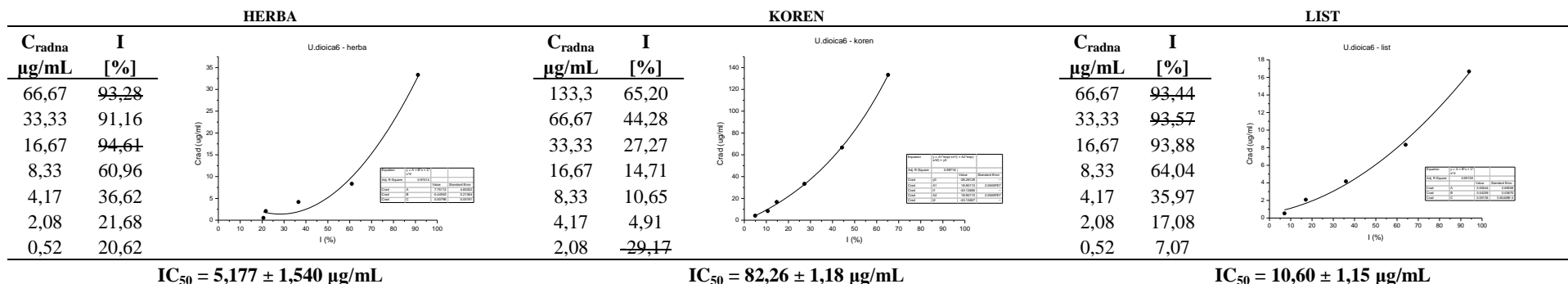
8.6. ANTIOKSIDANTNI POTENCIJAL EKSTRAKATA

Sposobnost neutralizacije DPPH^{} radikala*

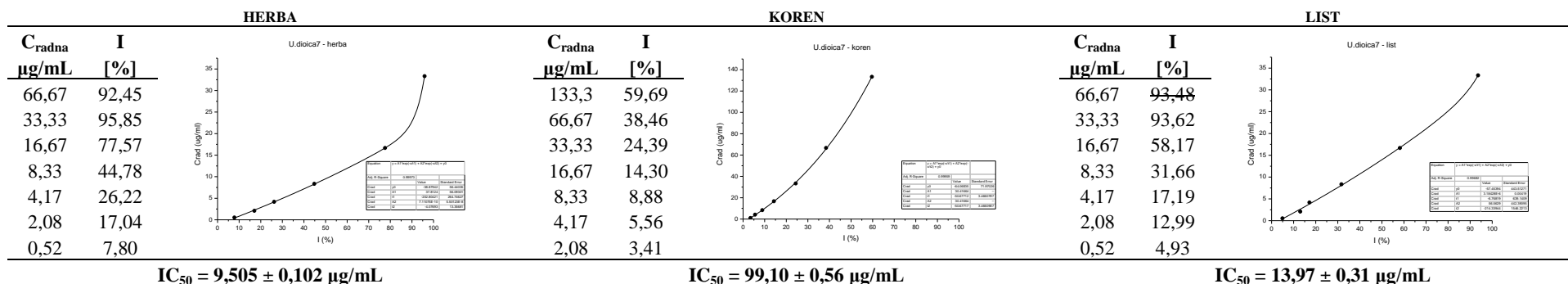
Tabela 8.19. Rezultati DPPH testa za sve ispitivane ekstrakte.



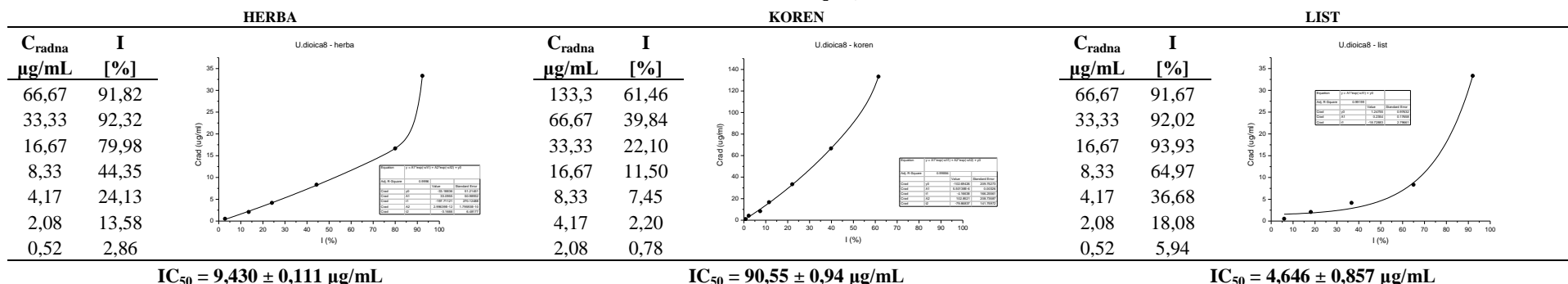
U. dioica6 (pub)



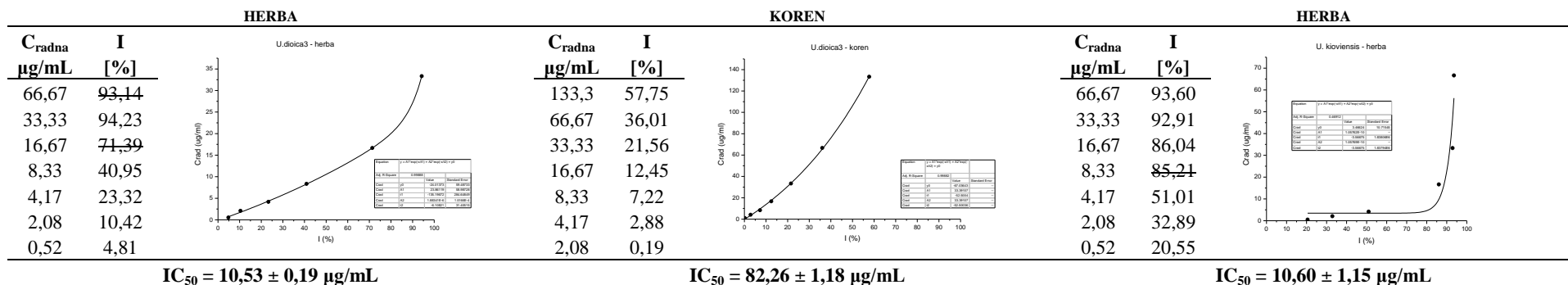
U. dioica7 (dio)



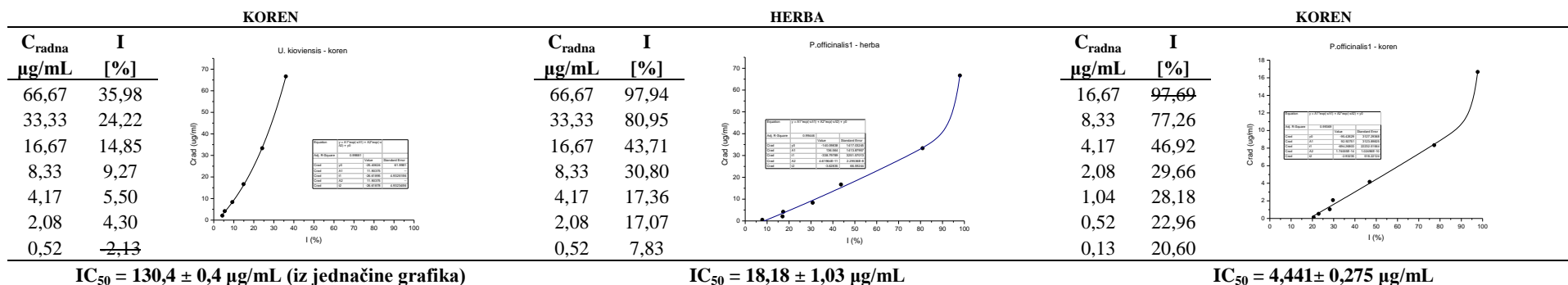
U. dioica8 (pub)



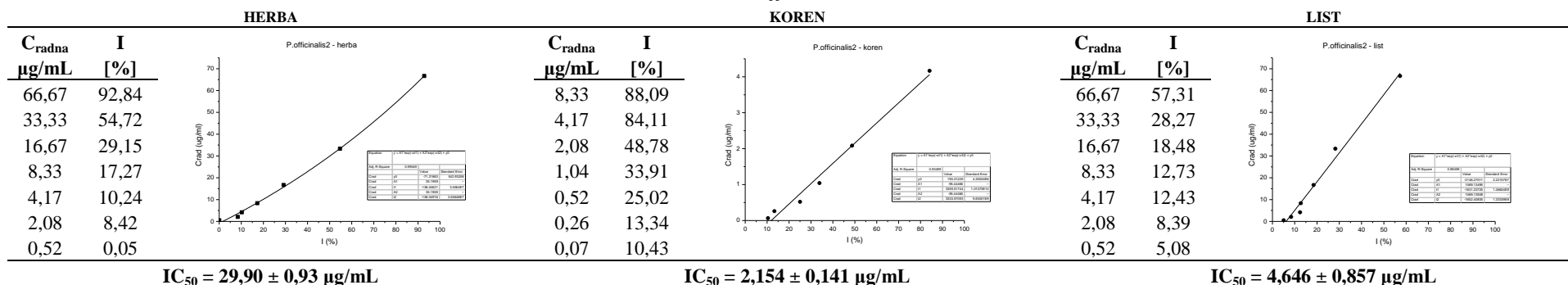
U. dioica3 (pub)



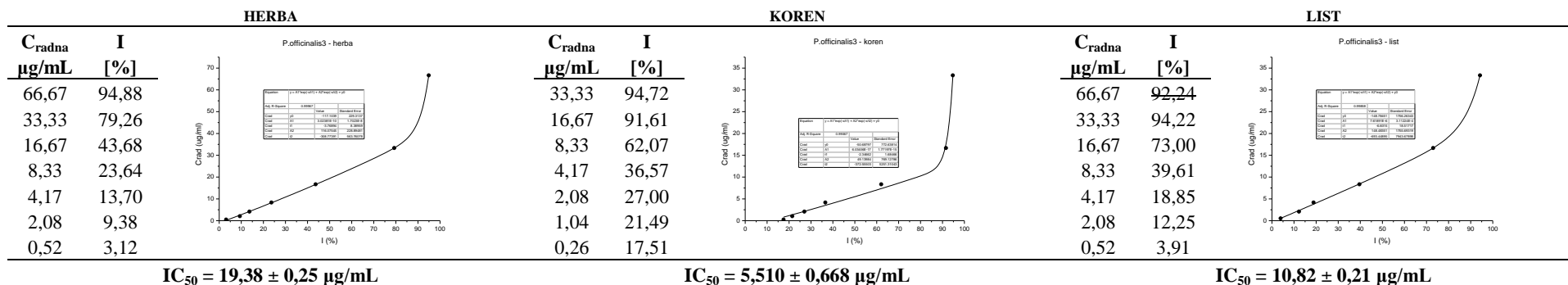
U. kioviensis



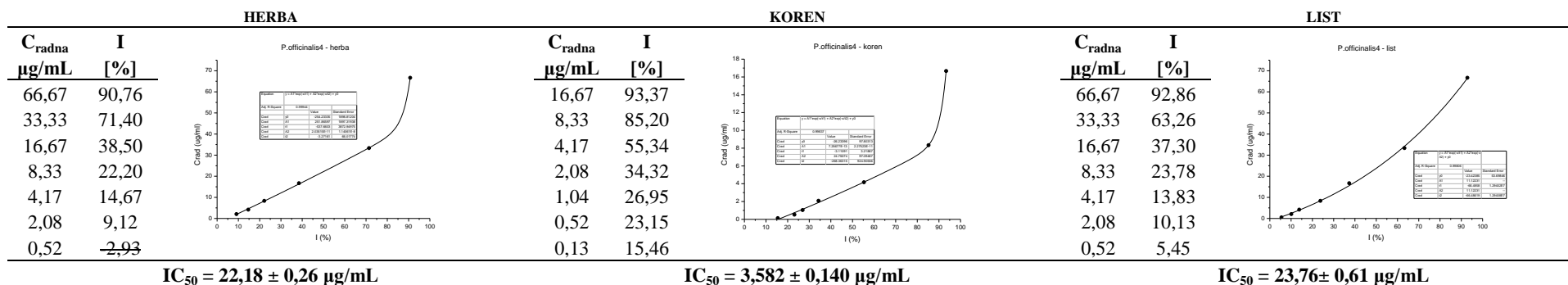
P. officinalis2



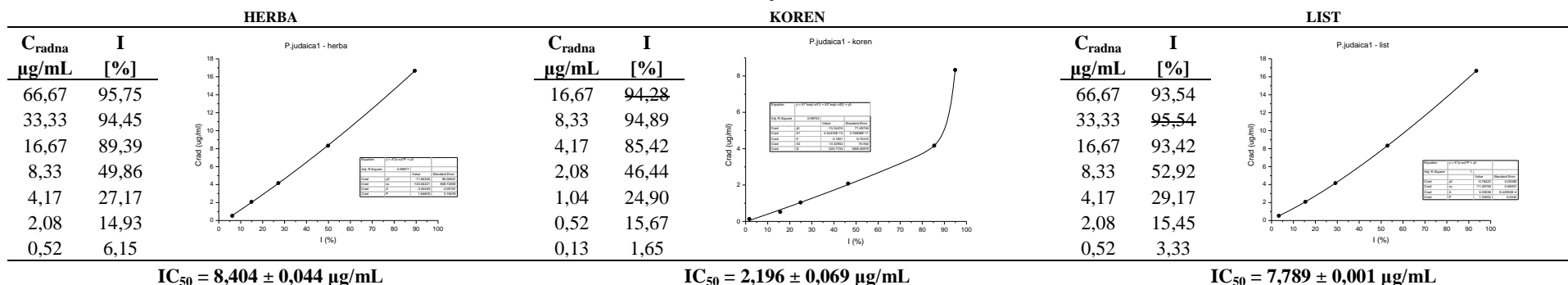
*P. officinalis*3

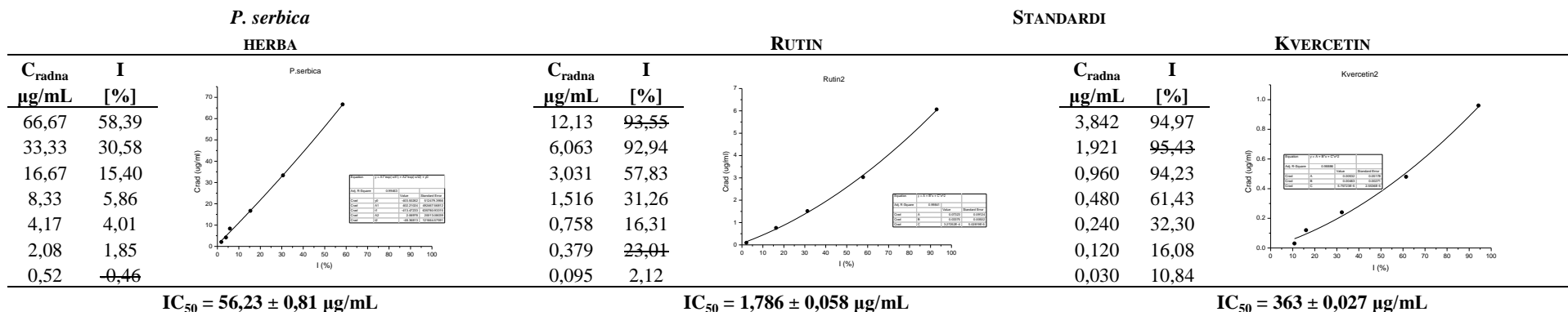
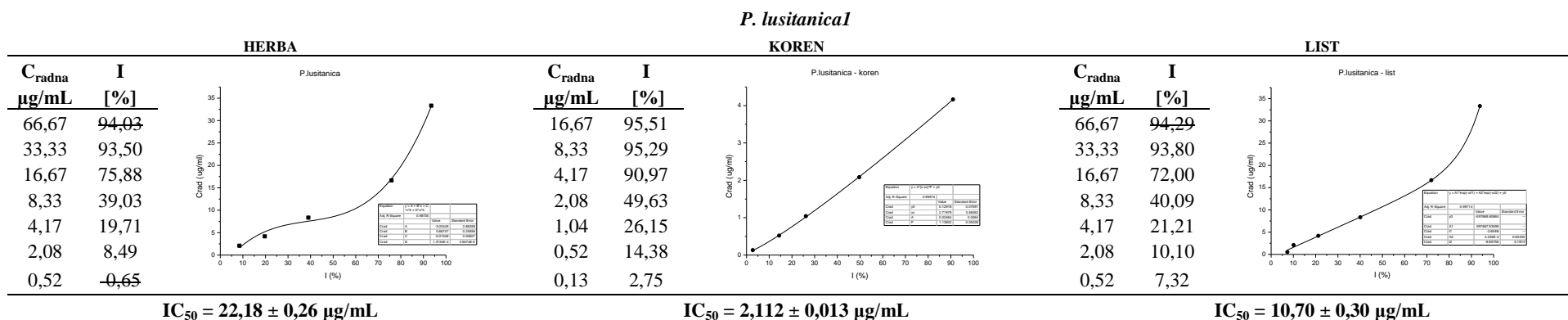
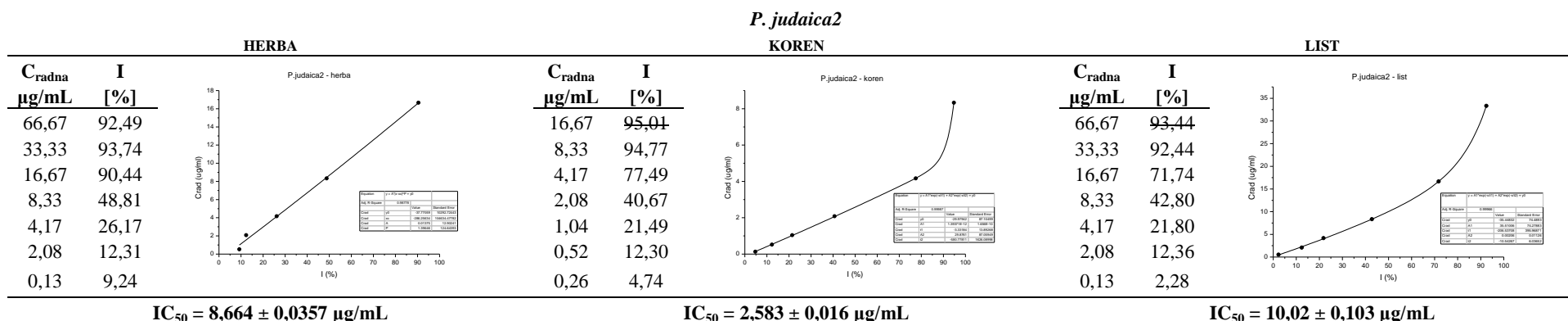


*P. officinalis*4



*P. judaica*1





BHT		STANDARDI		PG	
C _{radna} µg/mL	I [%]	C _{radna} µg/mL	I [%]	C _{radna} µg/mL	I [%]
66,67	94,75	4,133	90,98	4,600	94,06
33,33	93,92	2,067	76,08	2,300	94,05
16,67	86,85	1,033	44,28	1,150	94,46
8,33	71,42	0,517	27,61	0,575	90,90
4,17	50,45	0,258	16,71	0,288	54,14
2,08	29,86	0,129	7,66	0,144	28,16
0,52	11,04	0,032	1,55	0,036	8,23

BHT2		BHA2		PG2	

IC₅₀ = 4,210 ± 0,088 µg/mL		IC₅₀ = 5,510 ± 0,668 µg/mL		IC₅₀ = 10,82 ± 0,21 µg/mL	
--	--	--	--	---	--

U. dioica1 (pub) - infuz

HERBA		KOREN		LIST	
C _{radna} µg/mL	I [%]	C _{radna} µg/mL	I [%]	C _{radna} µg/mL	I [%]
83,33	98,89	166,7	73,68	83,33	94,18
41,67	78,59	83,33	40,14	41,67	93,24
20,83	45,37	41,67	22,10	20,83	73,37
10,42	25,95	20,83	12,56	10,42	44,32
5,208	12,72	10,42	4,85	5,208	31,56
2,604	10,10	5,208	1,22	2,604	18,84
		2,604	0,09		

U.dioica1 - herba (aq)		U.dioica1 - koren (aq)		U.dioica1 - list (aq)	

IC₅₀ = 23,35 ± 0,47 µg/mL		IC₅₀ = 104,5 ± 1,9 µg/mL		IC₅₀ = 10,14 ± 2,31 µg/mL	
---	--	--	--	---	--

P. judaica1 - infuz

HERBA		KOREN		LIST	
C _{radna} µg/mL	I [%]	C _{radna} µg/mL	I [%]	C _{radna} µg/mL	I [%]
166,7	85,12	166,7	99,42	166,7	92,22
83,33	78,45	83,33	96,14	83,33	92,22
41,67	92,30	41,67	92,07	41,67	90,97
20,83	66,99	20,83	67,47	20,83	67,25
10,42	36,79	10,42	40,11	10,42	35,49
5,208	18,95	5,208	26,09	5,208	18,64
2,604	10,46	2,604	11,66	2,604	14,31

P.judaica1 - herba (aq)		P.judaica1 - koren (aq)		P.judaica1 - list (aq)	

IC₅₀ = 15,15 ± 0,32 µg/mL		IC₅₀ = 13,77 ± 1,30 µg/mL		IC₅₀ = 13,11 ± 1,37 µg/mL	
---	--	---	--	---	--

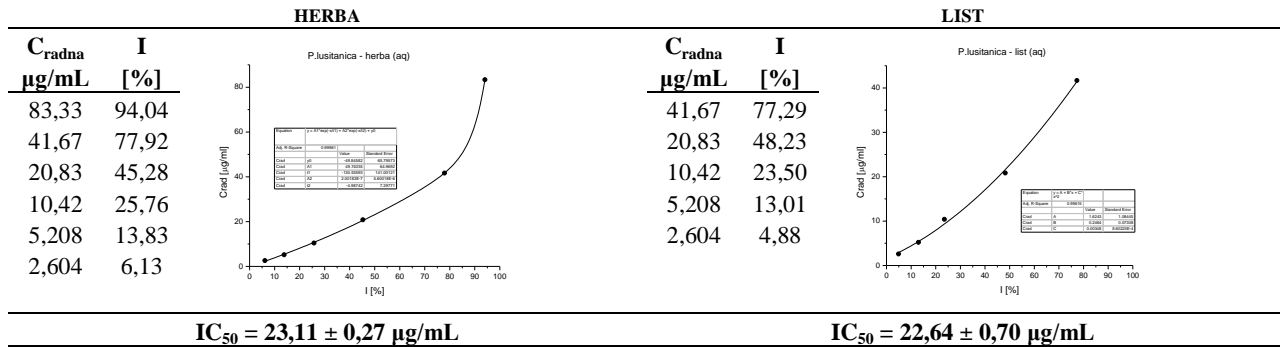
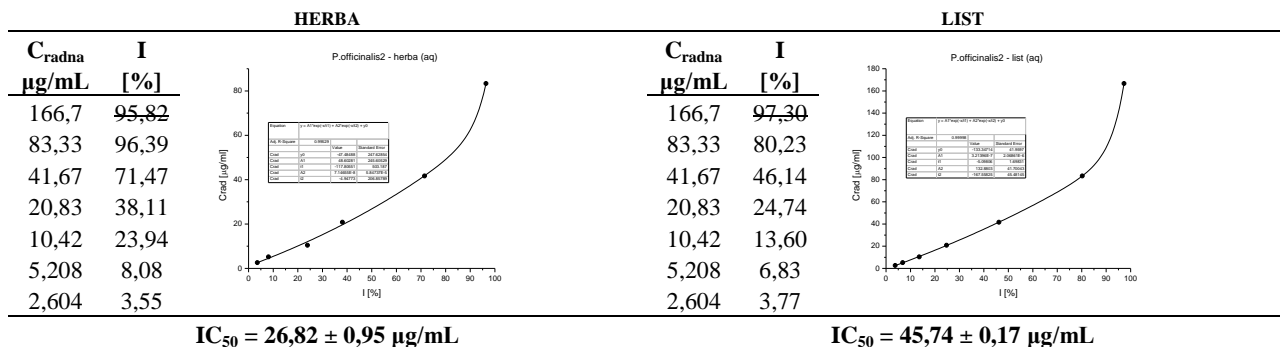
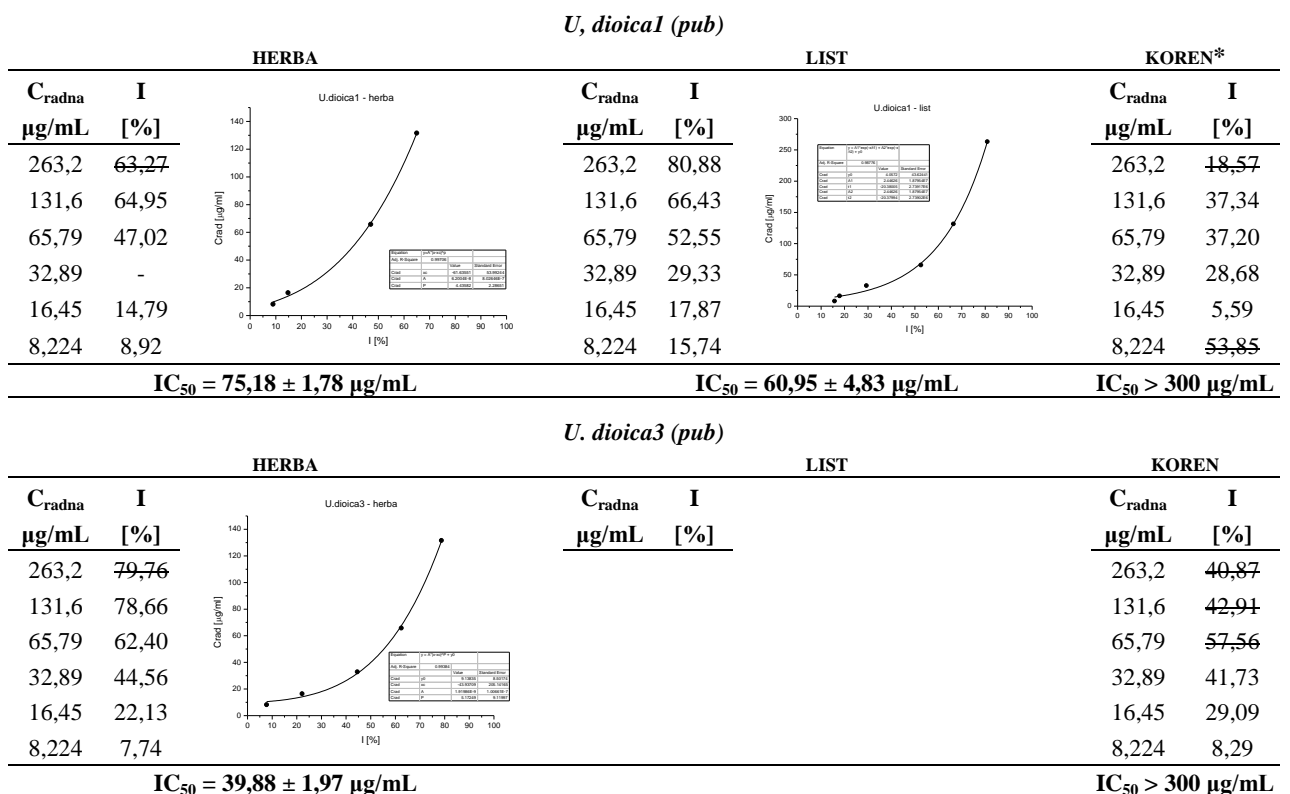
P. lusitanica1 - infuz*P. officinalis2* - infuz*Sposobnost neutralizacije SOA radikala*

Tabela 8.20. Rezultati SOA testa za sve ispitivane ekstrakte, (*metanolni ekstrakti korena vrsta roda *Urtica* su pri višim koncentracijama bili nerastvorni u vodenoj sredini u kojoj se odvija test te nije bilo moguće odrediti IC₅₀).



U. dioica4 (pub)

HERBA		LIST	KOREN		
C _{radna} μg/mL	I [%]	C _{radna} μg/mL	I [%]	C _{radna} μg/mL	I [%]
263,2	76,06	263,2	57,16	263,2	2,90
131,6	62,26	131,6	46,94	131,6	34,68
65,79	39,92	65,79	32,95	65,79	76,98
32,89	18,53	32,89	11,85	32,89	29,08
16,45	8,00	16,45	7,37	16,45	16,16
8,224	5,50	8,224	0,92	8,224	4,47
IC₅₀ = 85,78 ± 1,02 μg/mL		IC₅₀ = 158,9 ± 2,76 μg/mL		IC₅₀ > 300 μg/mL	

U. dioica5 (dio)

HERBA		LIST	KOREN		
C _{radna} μg/mL	I [%]	C _{radna} μg/mL	I [%]	C _{radna} μg/mL	I [%]
263,2	82,66	263,2	66,82	263,2	11,19
131,6	78,75	131,6	64,07	131,6	38,39
65,79	65,62	65,79	58,87	65,79	68,54
32,89	32,68	32,89	54,28	32,89	37,86
16,45	20,70	16,45	20,55	16,45	20,27
8,224	7,76	8,224	6,64	8,224	13,20
IC₅₀ = 48,54 ± 2,76 μg/mL		IC₅₀ = 26,45 ± 4,12 μg/mL		IC₅₀ > 300 μg/mL	

U. dioica6 (pub)

HERBA		LIST	KOREN		
C _{radna} μg/mL	I [%]	C _{radna} μg/mL	I [%]	C _{radna} μg/mL	I [%]
263,2	72,79	263,2	71,66	263,2	11,12
131,6	72,22	131,6	56,28	131,6	28,45
65,79	58,52	65,79	40,27	65,79	41,03
32,89	34,64	32,89	29,07	32,89	16,47
16,45	22,69	16,45	21,02	16,45	14,39
8,224	11,23	8,224	11,08	8,224	14,31
IC₅₀ = 48,49 ± 5,22 μg/mL		IC₅₀ = 45,74 ± 0,17 μg/mL		IC₅₀ > 300 μg/mL	

U. dioica7 (dio)

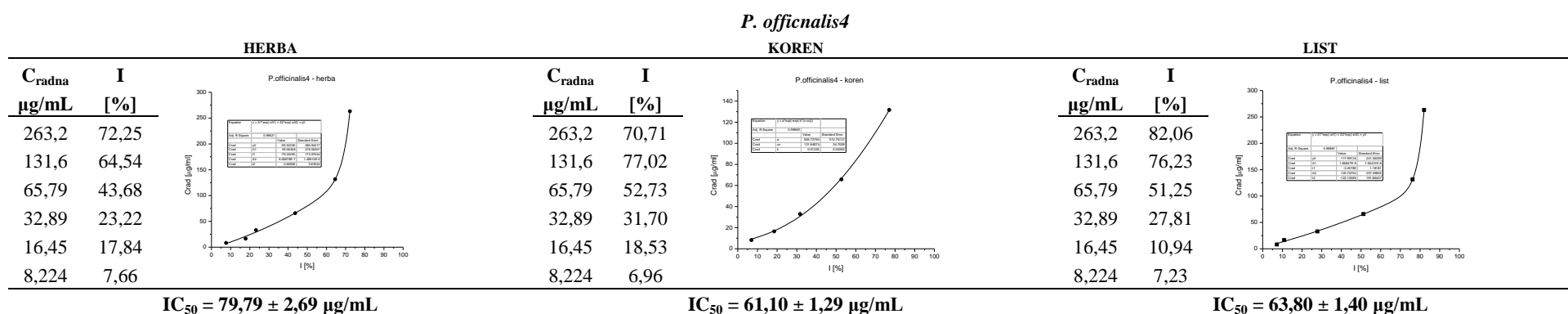
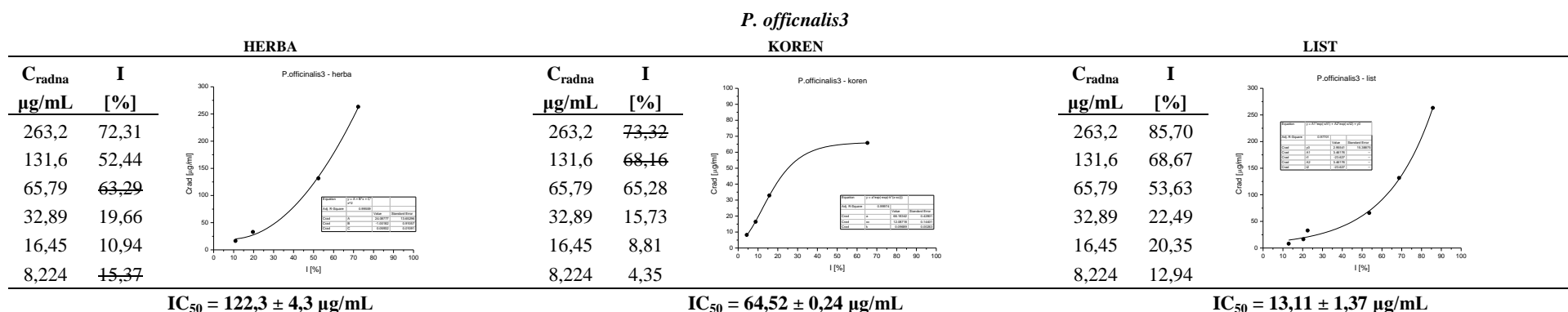
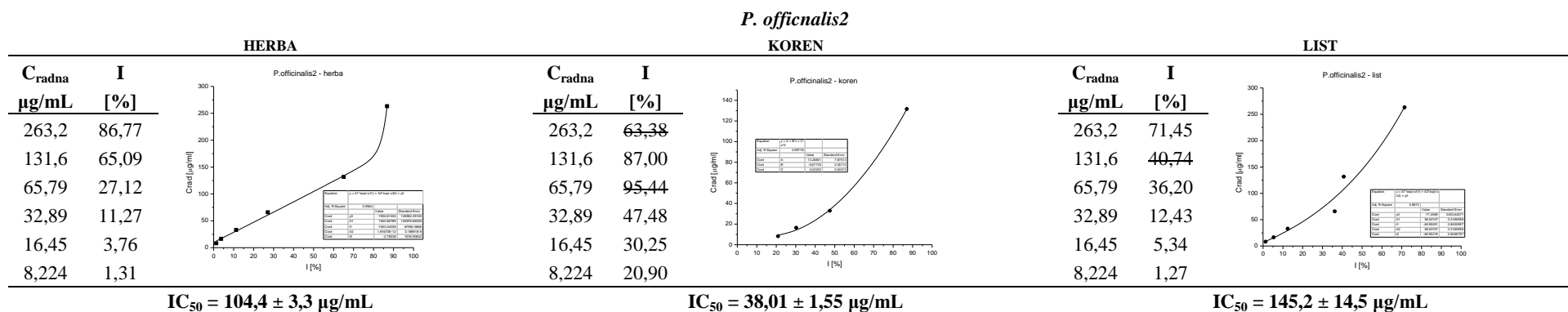
HERBA		LIST	KOREN		
C _{radna} μg/mL	I [%]	C _{radna} μg/mL	I [%]	C _{radna} μg/mL	I [%]
263,2	65,26	263,2	65,75	263,2	16,03
131,6	45,75	131,6	48,74	131,6	30,47
65,79	29,16	65,79	37,21	65,79	39,01
32,89	11,75	32,89	18,32	32,89	22,26
16,45	12,17	16,45	8,12	16,45	8,07
8,224	7,96	8,224	5,16	8,224	3,11
IC₅₀ = 155,4 ± 6,4 μg/mL		IC₅₀ = 133,2 ± 5,3 μg/mL		IC₅₀ > 300 μg/mL	

Nastavak Tabele 8.20.

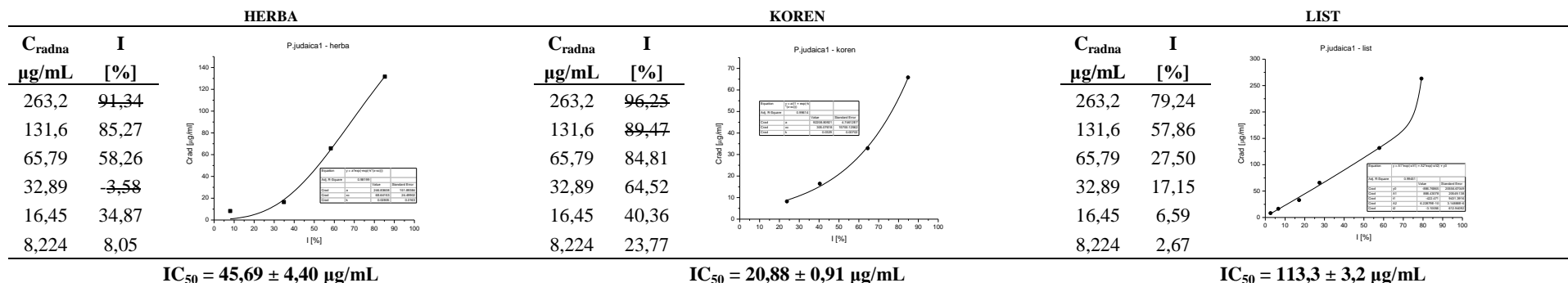
HERBA		<i>U. dioica8 (pub)</i>		LIST		KOREN	
C_{radna} µg/mL	I [%]	C_{radna} µg/mL	I [%]	C_{radna} µg/mL	I [%]	C_{radna} µg/mL	I [%]
263,2	83,43	263,2	82,08			263,2	34,09
131,6	84,82	131,6	77,48			131,6	54,64
65,79	65,64	65,79	53,20			65,79	54,86
32,89	35,65	32,89	30,19			32,89	34,49
16,45	18,77	16,45	12,46			16,45	15,48
8,224	11,50	8,224	7,25			8,224	5,77
IC₅₀ = 41,76 ± 4,92 µg/mL		IC₅₀ = 60,61 ± 1,13 µg/mL		IC₅₀ > 300 µg/mL			

HERBA		<i>U. kioviensis</i>		LIST		KOREN	
C_{radna} µg/mL	I [%]	C_{radna} µg/mL	I [%]	C_{radna} µg/mL	I [%]	C_{radna} µg/mL	I [%]
263,2	88,97	263,2	91,58			263,2	22,31
131,6	91,46	131,6	87,73			131,6	28,03
65,79	84,76	65,79	81,61			65,79	27,75
32,89	73,61	32,89	59,11			32,89	29,57
16,45	69,98	16,45	37,80			16,45	29,37
8,224	59,08	8,224	27,19			8,224	27,53
IC₅₀ = 2,597 ± 1,071 µg/mL (očitano sa grafika)		IC₅₀ = 25,92 ± 0,04 µg/mL		IC₅₀ > 300 µg/mL			

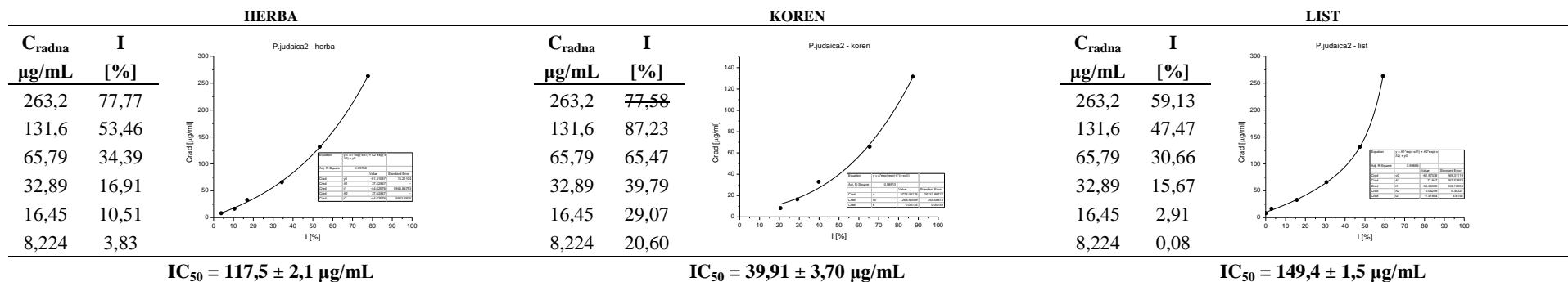
HERBA		<i>P. officinalis1</i>		KOREN		<i>P. serbica</i>	
C_{radna} µg/mL	I [%]	C_{radna} µg/mL	I [%]	C_{radna} µg/mL	I [%]	C_{radna} µg/mL	I [%]
263,2	83,19	263,2	68,79			263,2	58,04
131,6	63,55	131,6	64,51			131,6	29,76
65,79	42,36	65,79	57,70			65,79	14,64
32,89	15,57	32,89	21,06			32,89	4,54
16,45	9,09	16,45	11,23			16,45	2,10
8,224	4,41	8,224	7,93			8,224	-6,21
IC₅₀ = 84,25 ± 5,37 µg/mL		IC₅₀ = 52,21 ± 4,56 µg/mL		IC₅₀ = 230,6 ± 4,2 µg/mL			



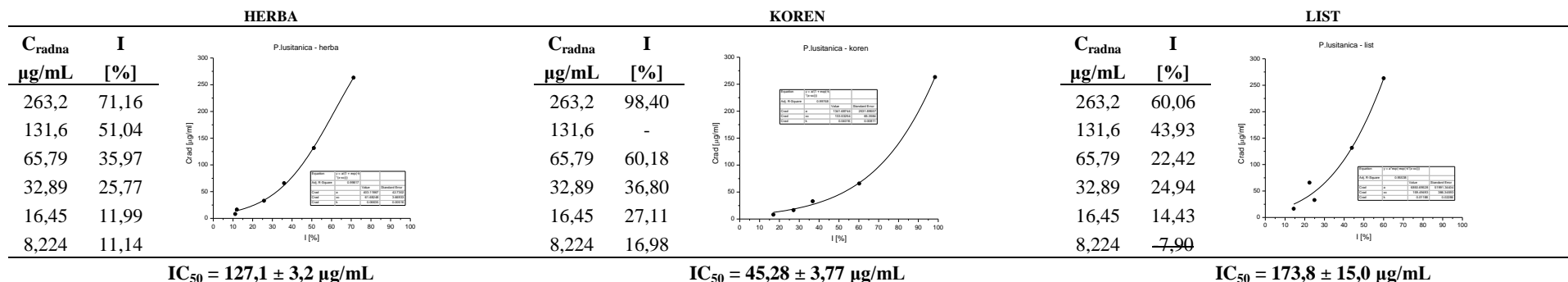
P. judaica1

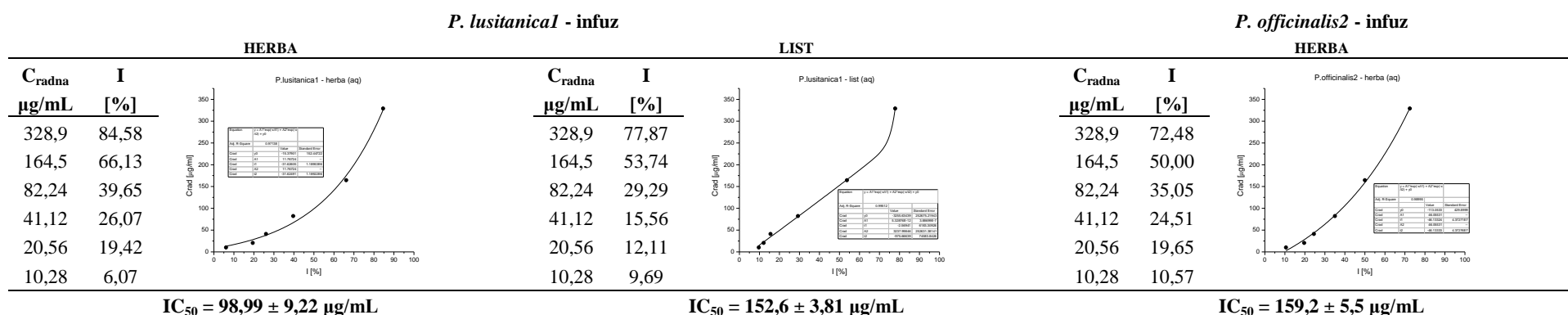
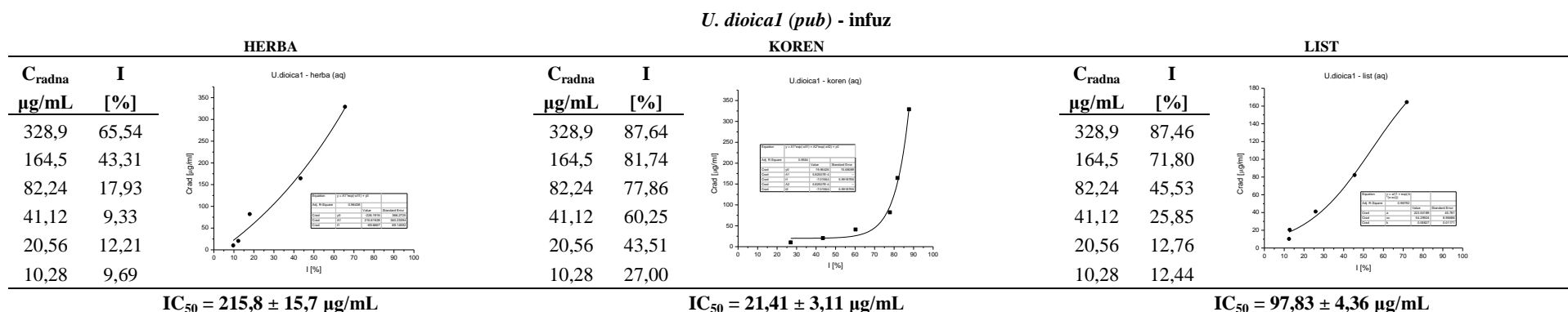
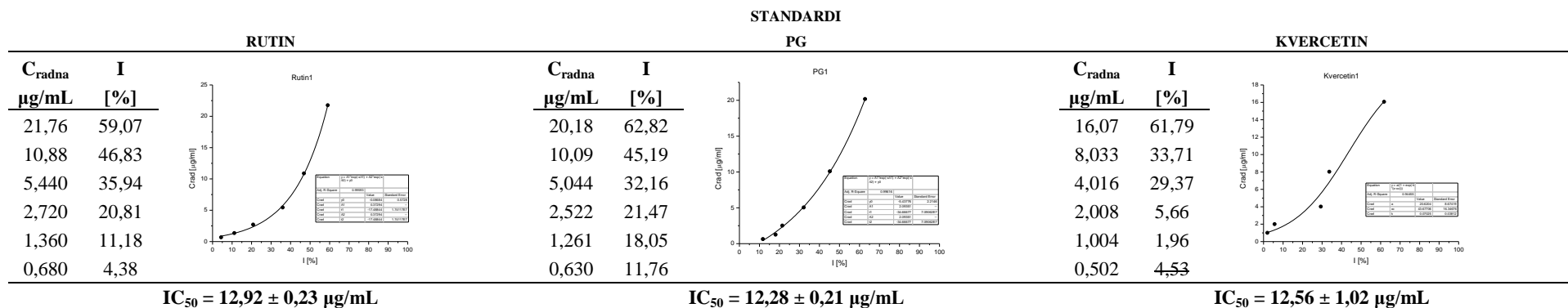


P. judaica2



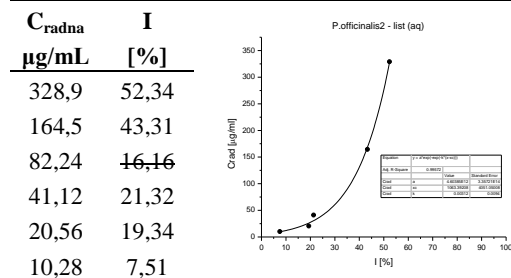
P. lusitanical



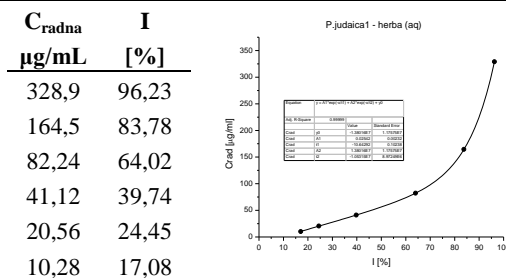


*P. officinalis*2 - infuz

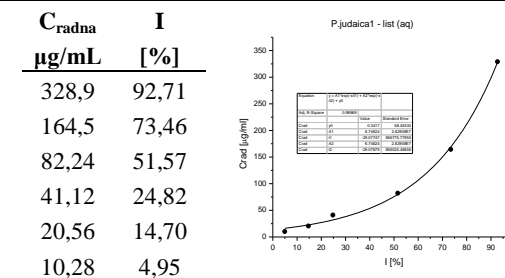
LIST

 $IC_{50} = 276,1 \pm 5,6 \mu\text{g/mL}$ *P. judaica*1 - infuz

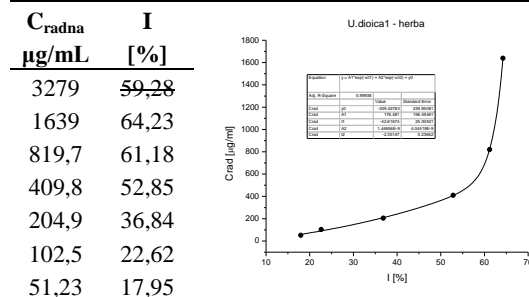
HERBA

 $IC_{50} = 56,30 \pm 0,16 \mu\text{g/mL}$

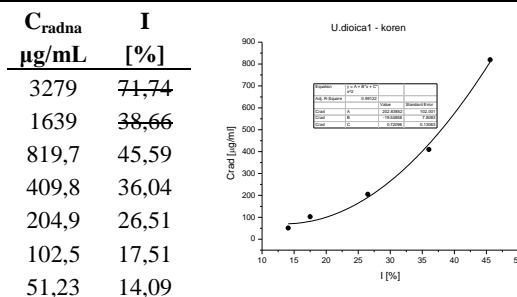
LIST

 $IC_{50} = 75,66 \pm 5,54 \mu\text{g/mL}$ Sposobnost neutralizacije NO^{\bullet} radikalaTabela 8.21. Rezultati NO testa za sve ispitivane ekstrakte.*U. dioica*1 (pub)

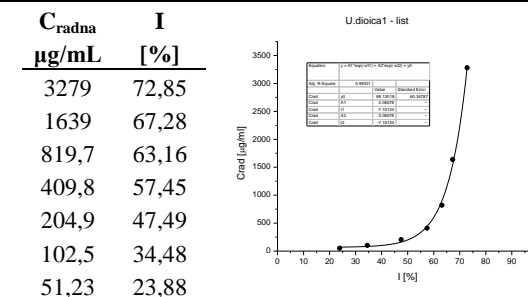
HERBA

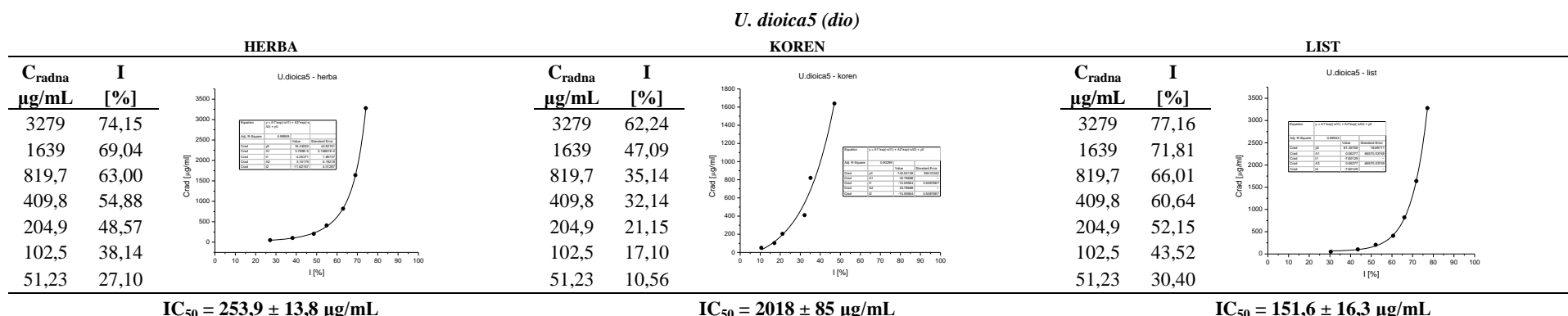
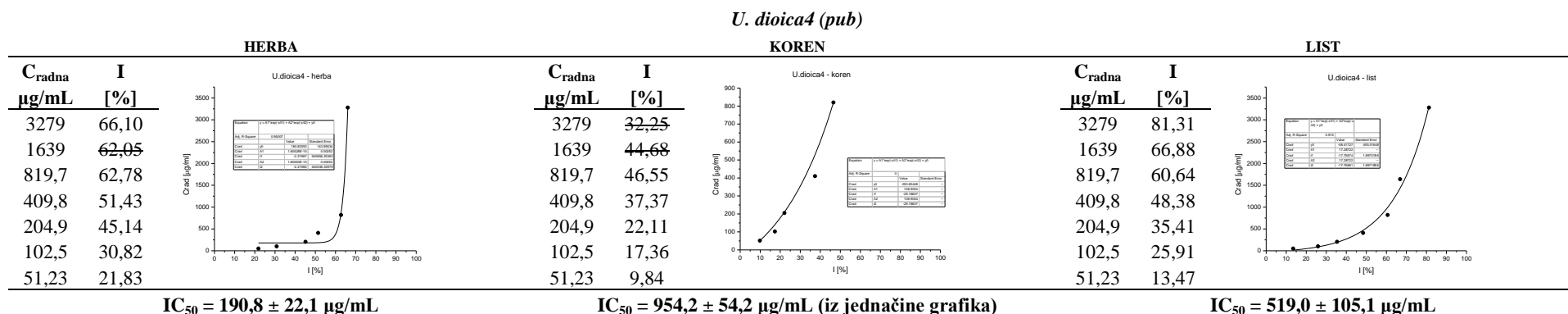
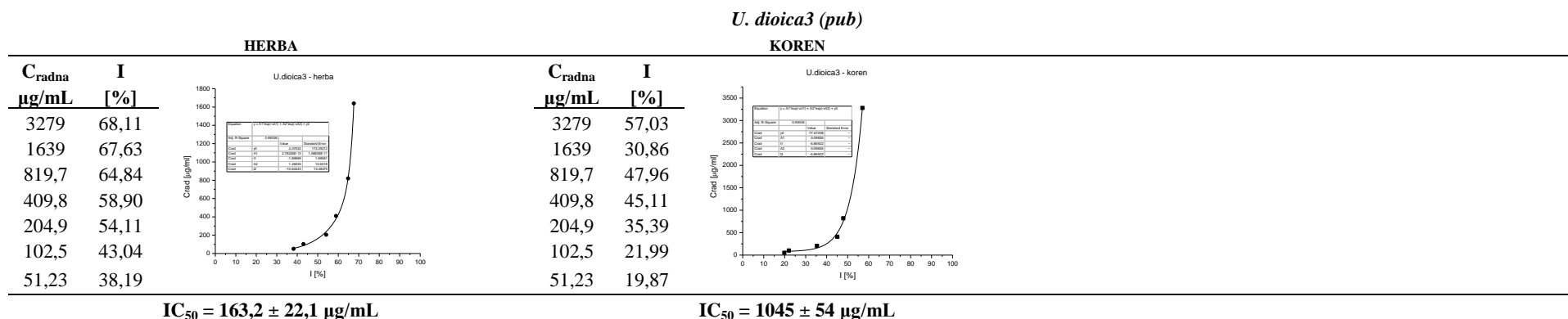
 $IC_{50} = 363,5 \pm 6,8 \mu\text{g/mL}$

KOREN

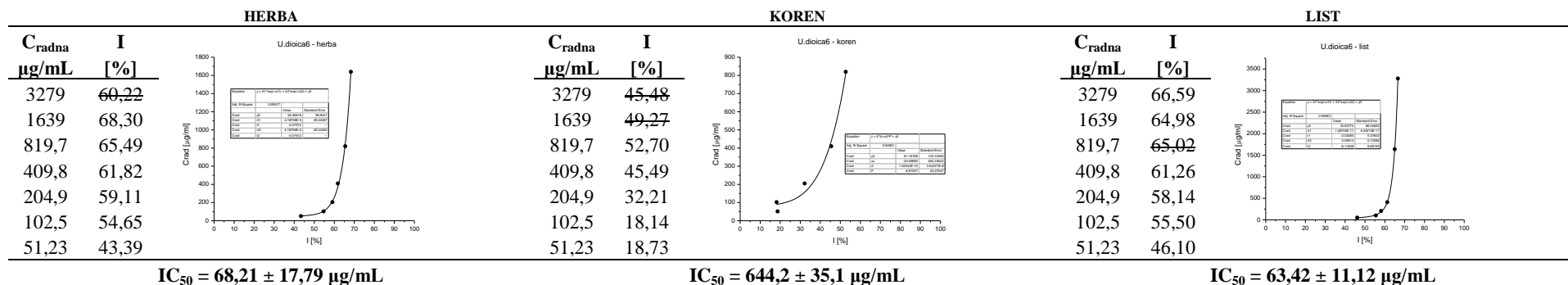
 $IC_{50} = 1028 \pm 21 \mu\text{g/mL}$ (iz jednačine grafika)

LIST

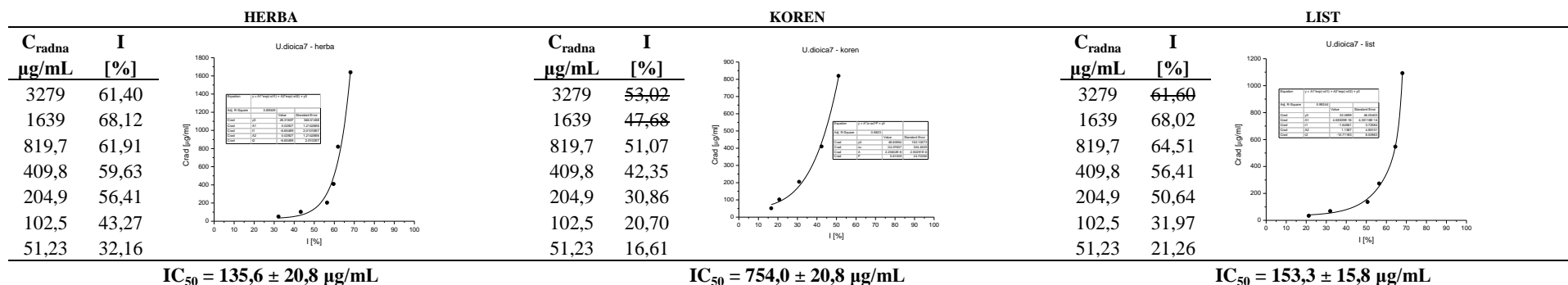
 $IC_{50} = 200,3 \pm 55,5 \mu\text{g/mL}$



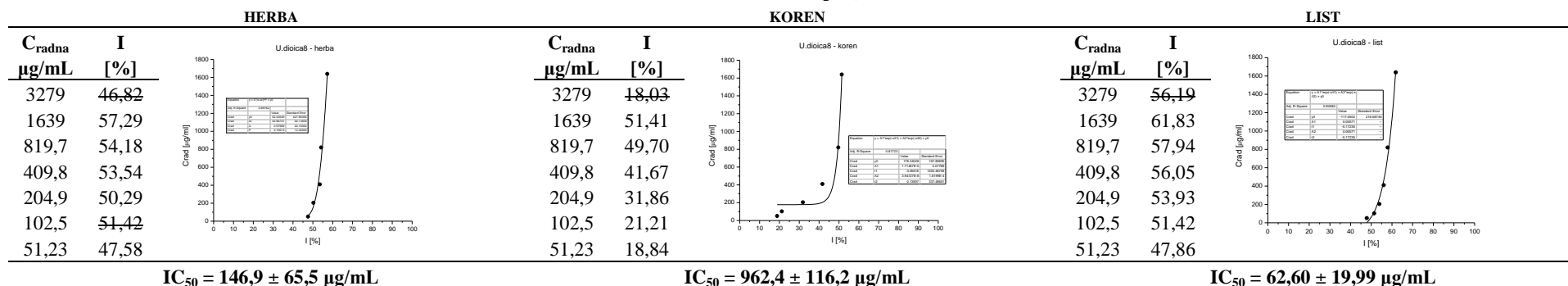
U. dioica6 (pub)



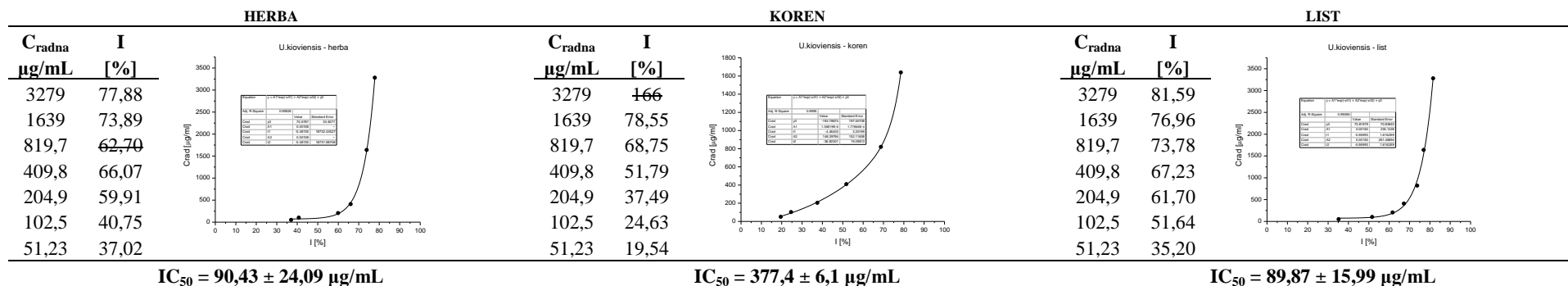
U. dioica7 (dio)



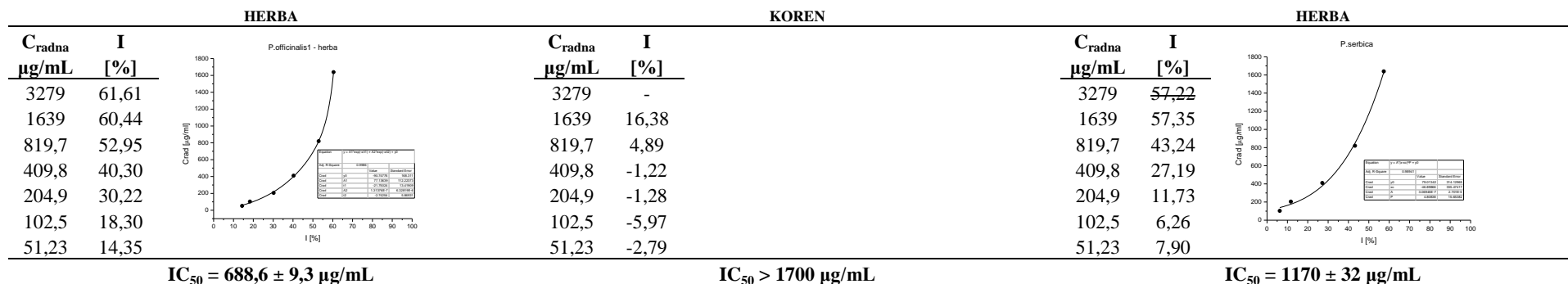
U. dioica8 (pub)



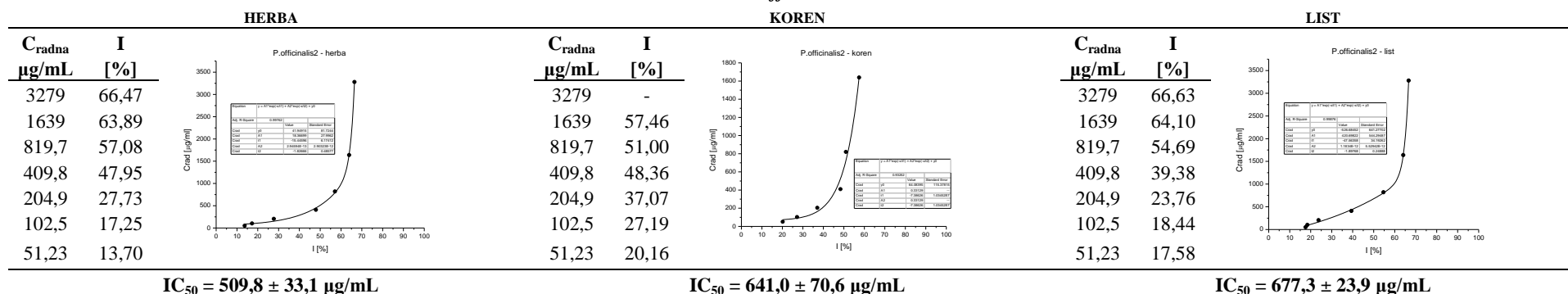
U. kioviensis

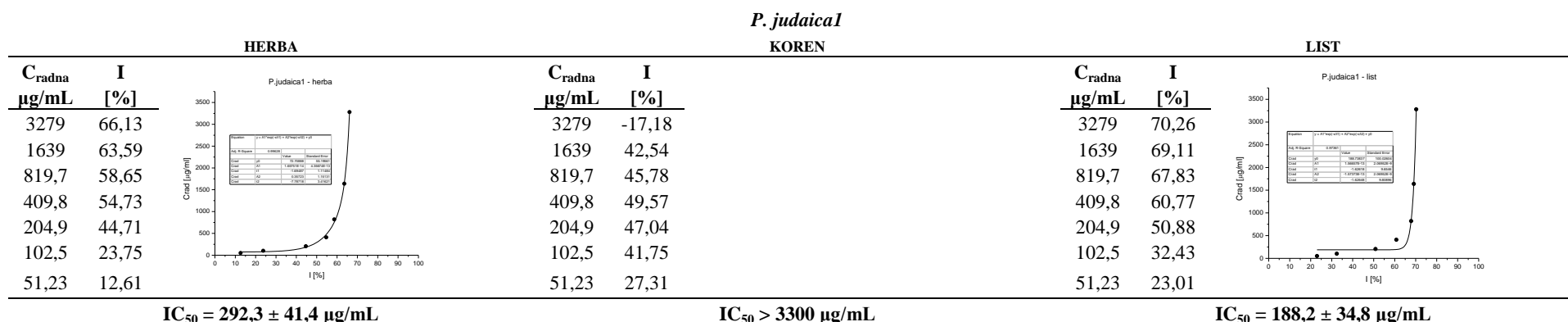
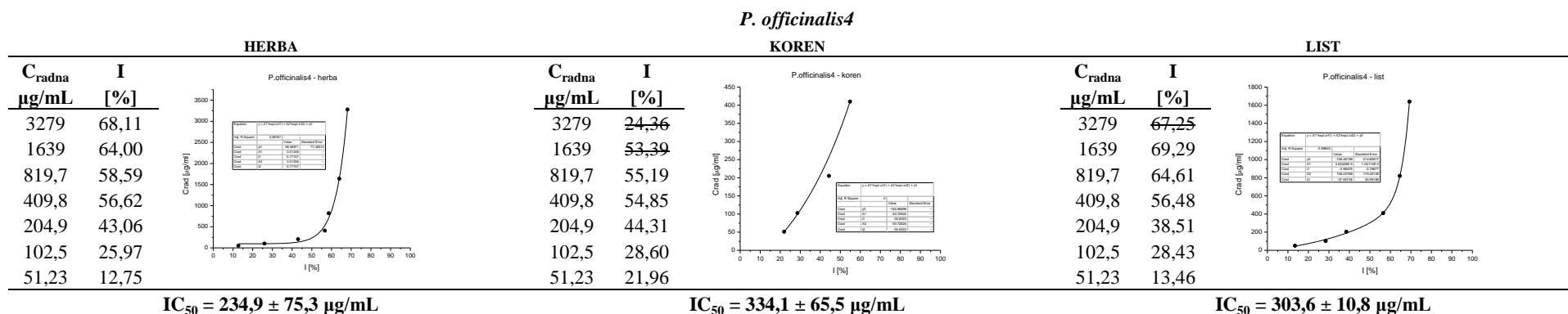
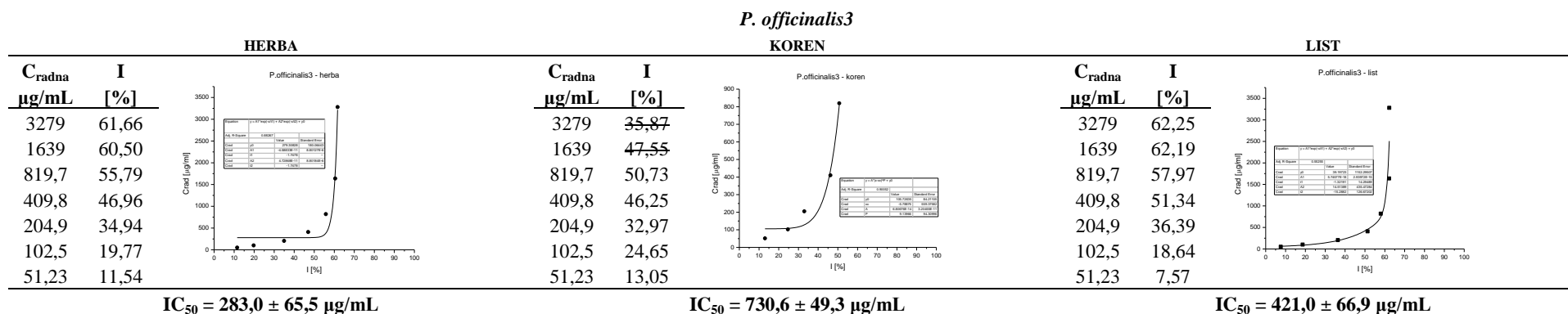


P. officinalis1



P. officinalis2





P. judaica2

HERBA		KOREN		LIST	
C _{radna} µg/mL	I [%]	C _{radna} µg/mL	I [%]	C _{radna} µg/mL	I [%]
3279	67,82	1639	20,26	1639	55,10
1639	62,05	819,7	29,05	819,7	75,61
819,7	57,52	409,8	29,78	409,8	60,64
409,8	52,55	204,9	34,90	204,9	52,58
204,9	41,81	102,5	31,01	102,5	37,15
102,5	24,33	51,23	18,83	51,23	20,04
51,23	17,48	25,61	18,98	25,61	12,32
IC₅₀ = 358,1 ± 55,4 µg/mL		IC₅₀ > 3300 µg/mL		IC₅₀ = 211,7 ± 24,2 µg/mL	

P. lusitanica1

HERBA		KOREN		LIST	
C _{radna} µg/mL	I [%]	C _{radna} µg/mL	I [%]	C _{radna} µg/mL	I [%]
3279	51,35	3279	38,58	1639	60,76
1639	51,00	1639	51,38	819,7	48,62
819,7	48,99	819,7	47,44	409,8	44,89
409,8	43,59	409,8	45,60	204,9	37,87
204,9	33,01	204,9	35,28	102,5	25,75
102,5	22,45	102,5	27,36	51,23	17,29
51,23	16,57	51,23	16,78	25,61	12,75
IC₅₀ = 1112 ± 3 µg/mL		IC₅₀ = 1232 ± 72 µg/mL		IC₅₀ = 745,4 ± 80,3 µg/mL	

P. lusitanica2

HERBA		KOREN		LIST	
C _{radna} µg/mL	I [%]	C _{radna} µg/mL	I [%]	C _{radna} µg/mL	I [%]
3279	46,09	3279	22,76	1639	30,88
1639	43,83	1639	49,86	819,7	51,99
819,7	33,73	819,7	41,23	409,8	55,16
409,8	25,15	409,8	39,66	204,9	49,58
204,9	16,19	204,9	34,20	102,5	28,40
102,5	13,03	102,5	28,01	51,23	18,34
51,23	13,68	51,23	24,78	25,61	9,94
IC₅₀ > 3300 µg/mL		IC₅₀ = 1676 ± 64,0 µg/mL		IC₅₀ = 219,0 ± 27,1 µg/mL	

U. dio1(pub) - infuz

HERBA		KOREN		LIST	
<i>C_{radna}</i> μg/mL	<i>I</i> [%]	<i>C_{radna}</i> μg/mL	<i>I</i> [%]	<i>C_{radna}</i> μg/mL	<i>I</i> [%]
3125	75,86	3125	48,91	3125	81,40
1563	73,86	1563	43,70	1563	62,76
781,3	68,08	781,3	49,12	781,3	72,88
390,6	47,42	390,6	44,16	390,6	65,67
195,3	48,18	195,3	30,61	195,3	57,53
97,66	36,22	97,66	23,77	97,66	45,44
48,83	20,19	48,83	8,22	48,83	25,88
IC₅₀ = 220,5 ± 0,7 μg/mL		IC₅₀ > 650 μg/mL		IC₅₀ = 128,9 ± 8,5 μg/mL	

HERBA		KOREN		LIST	
<i>C_{radna}</i> μg/mL	<i>I</i> [%]	<i>C_{radna}</i> μg/mL	<i>I</i> [%]	<i>C_{radna}</i> μg/mL	<i>I</i> [%]
3125	73,43	1563	43,87	3125	82,41
1563	79,58	781,3	37,34	1563	76,14
781,3	74,53	390,6	38,64	781,3	73,52
390,6	63,24	195,3	35,42	390,6	64,65
195,3	50,17	97,66	23,62	195,3	54,62
97,66	35,77	48,83	15,57	97,66	38,32
48,83	17,92			48,83	22,32
IC₅₀ = 196,9 ± 2,7 μg/mL		IC₅₀ > 650 μg/mL		IC₅₀ = 120,2 ± 14,7 μg/mL	

P. officinalis2 - infuz

HERBA		HERBA		LIST	
<i>C_{radna}</i> μg/mL	<i>I</i> [%]	<i>C_{radna}</i> μg/mL	<i>I</i> [%]	<i>C_{radna}</i> μg/mL	<i>I</i> [%]
3125	67,61	3125	65,14	3125	69,39
1563	59,83	1563	63,43	1563	68,52
781,3	58,91	781,3	56,13	781,3	70,25
390,6	48,62	390,6	44,23	390,6	63,34
195,3	36,73	195,3	30,43	195,3	45,70
97,66	22,17	97,66	15,50	97,66	27,97
48,83	8,90	48,83	7,12	48,83	14,40
IC₅₀ = 426,8 ± 56,1 μg/mL		IC₅₀ = 527,1 ± 4,2 μg/mL		IC₅₀ = 233,8 ± 3,1 μg/mL	

STANDARDI

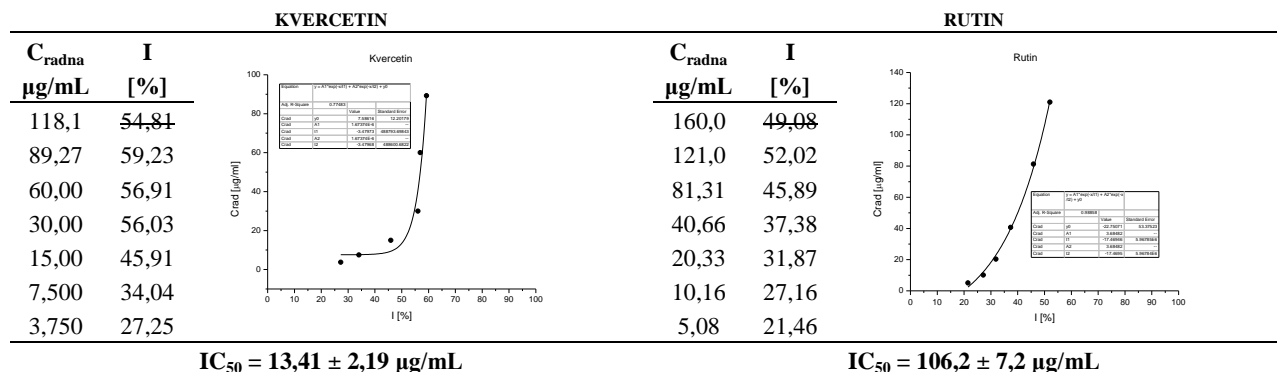
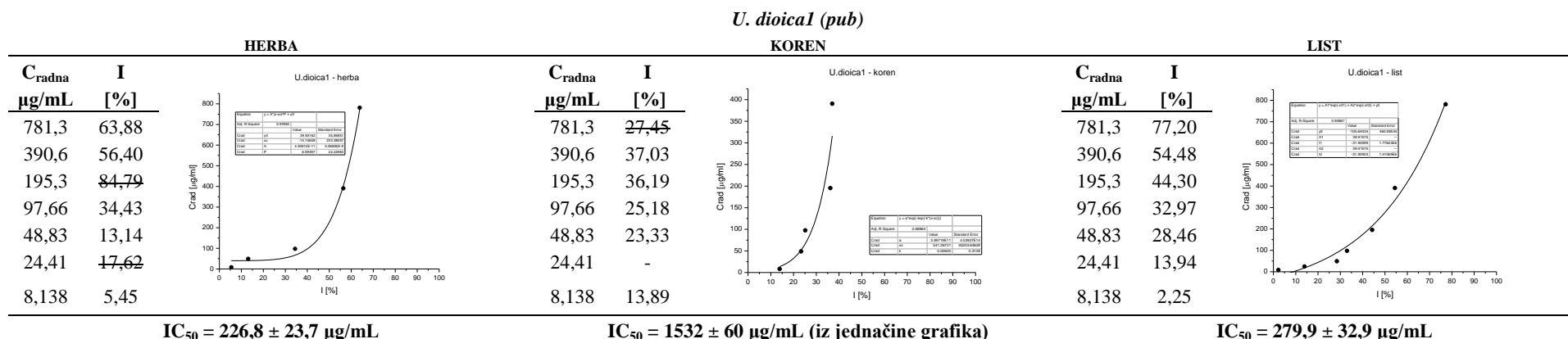
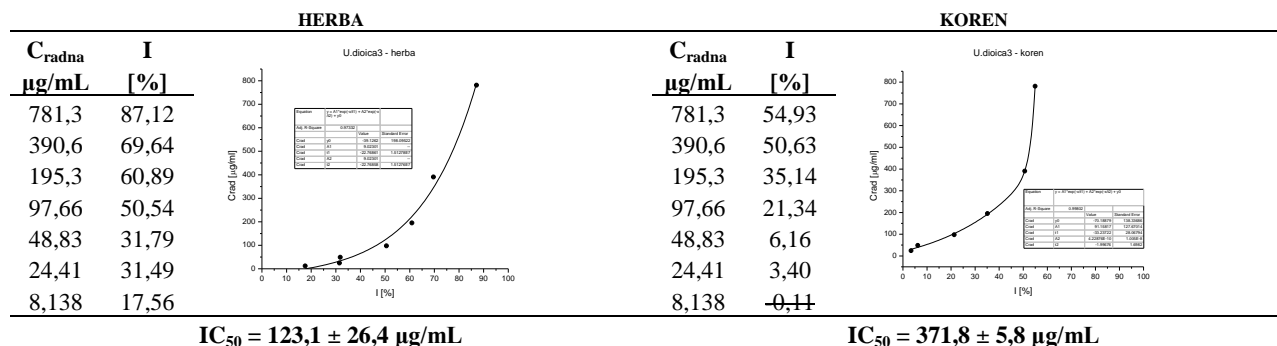
Sposobnost neutralizacije OH^{\bullet} radikala

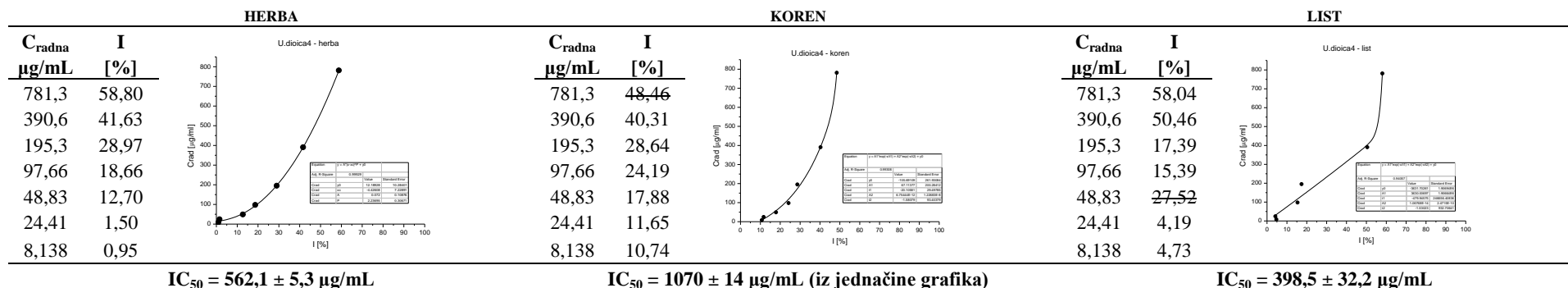
Tabela 8.22. Rezultati OH testa za sve ispitivane ekstrakte.



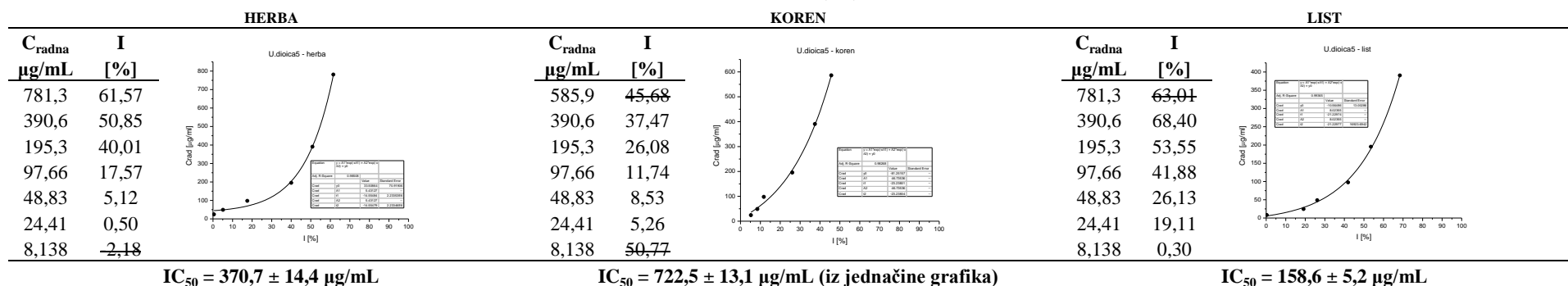
U. dioica3 (pub)

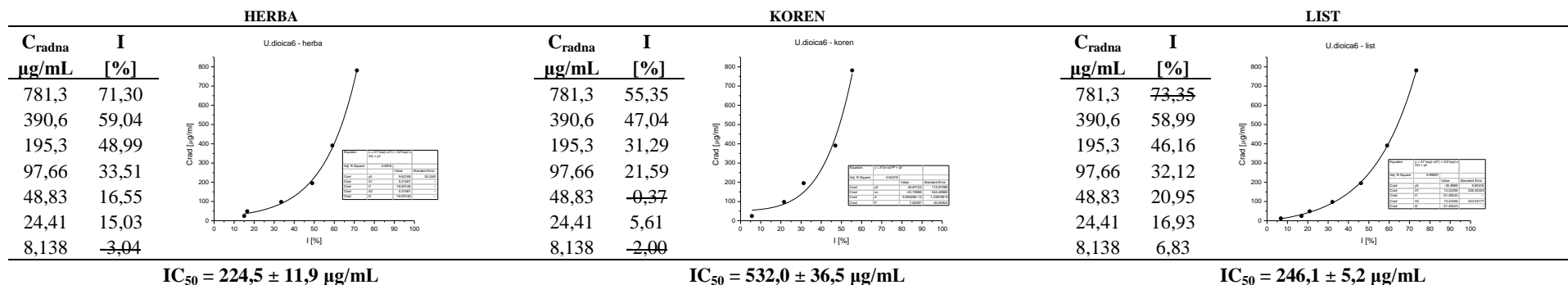
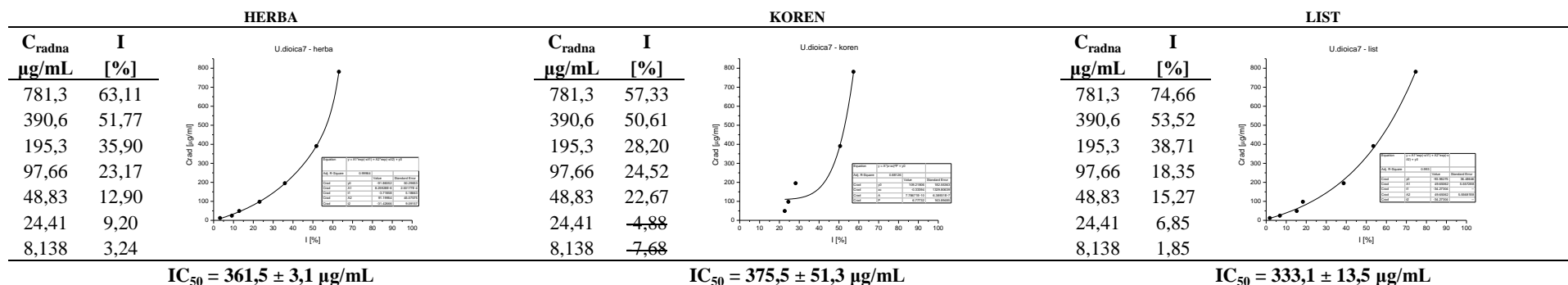
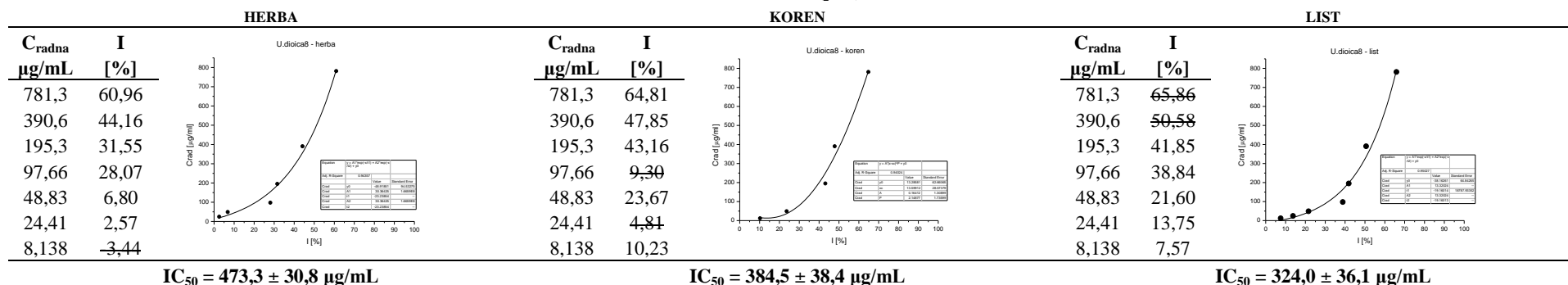


U. dioica4 (pub)

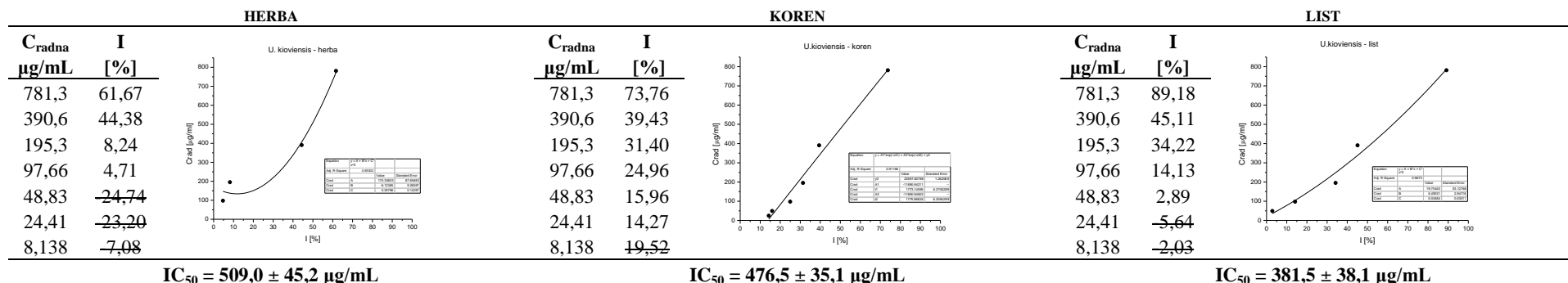


U. dioica5 (dio)

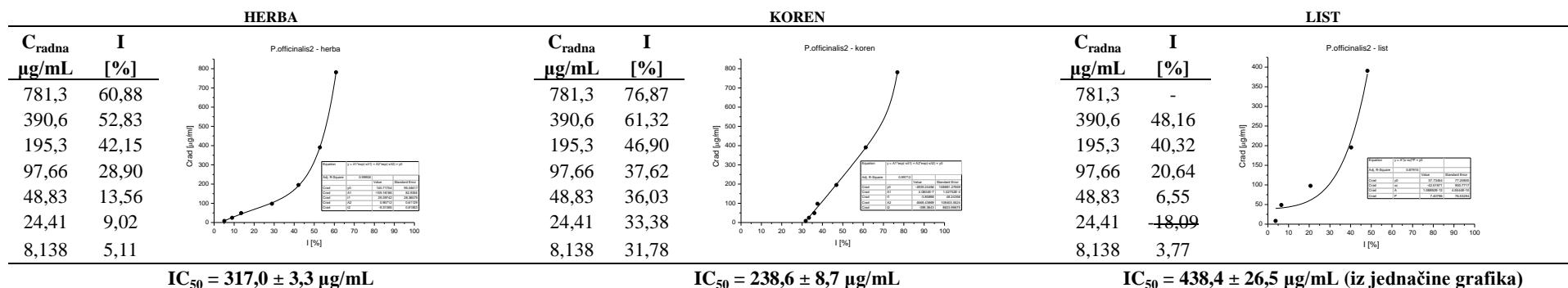


U. dioica6 (pub)*U. dioica7 (dio)**U. dioica8 (pub)*

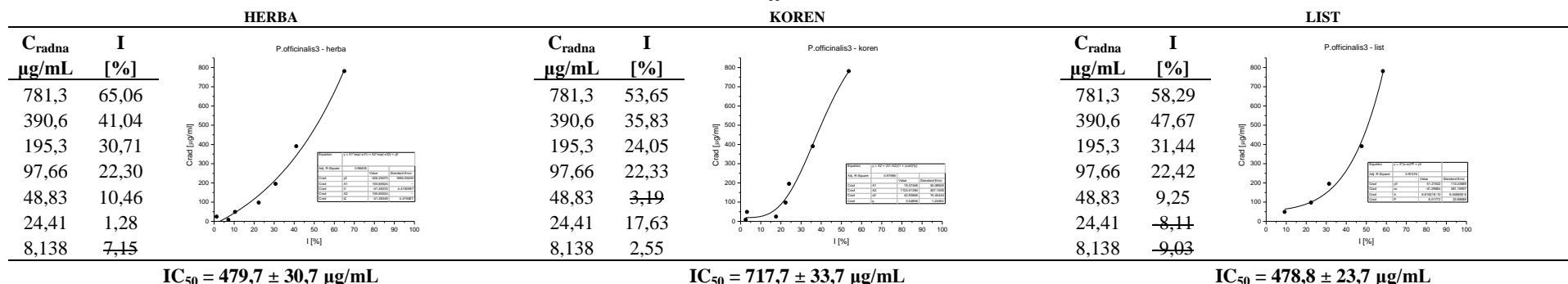
U. kioviensis



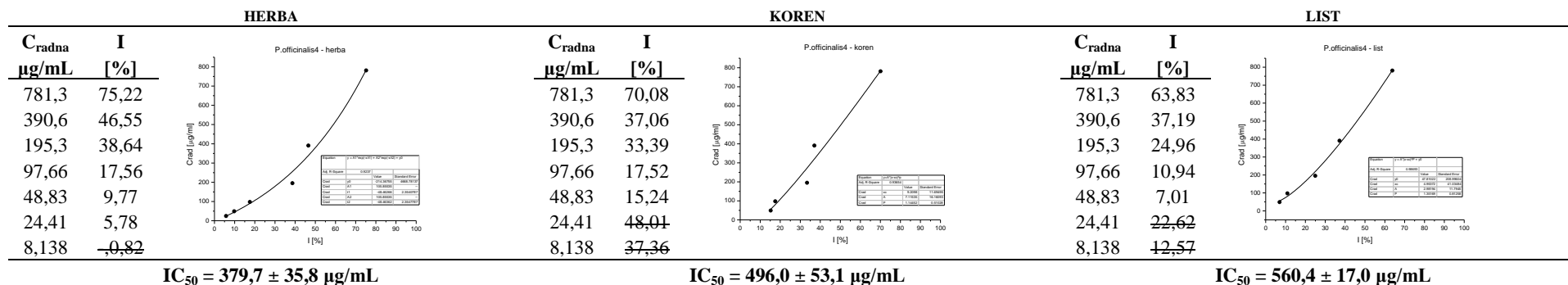
P. officinalis2



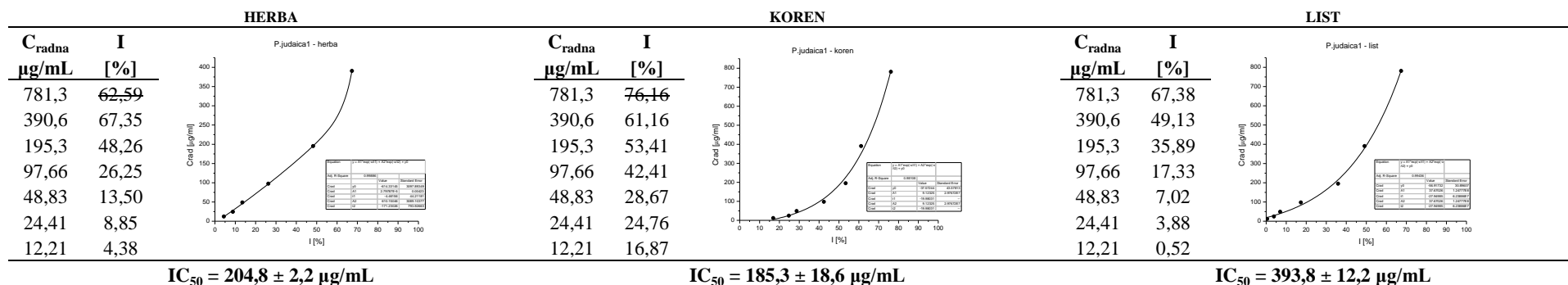
P. officinalis3



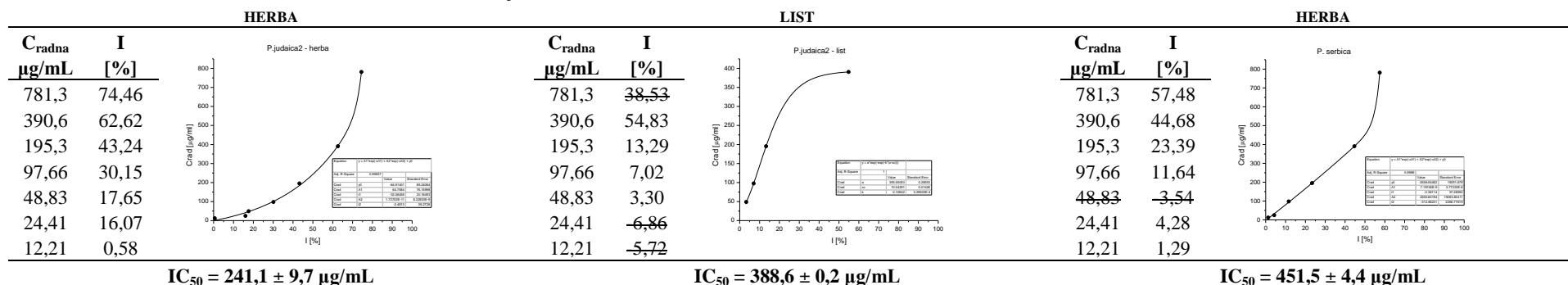
*P. officinalis*4



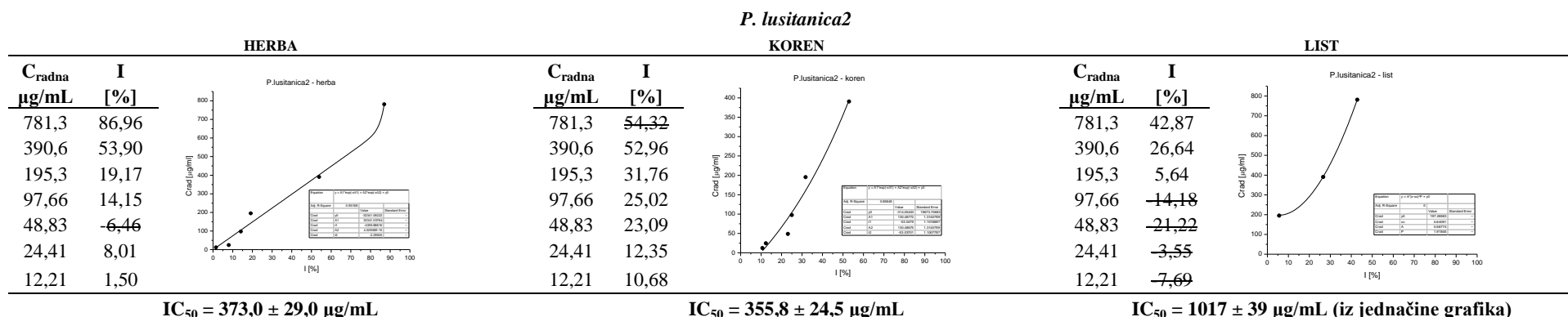
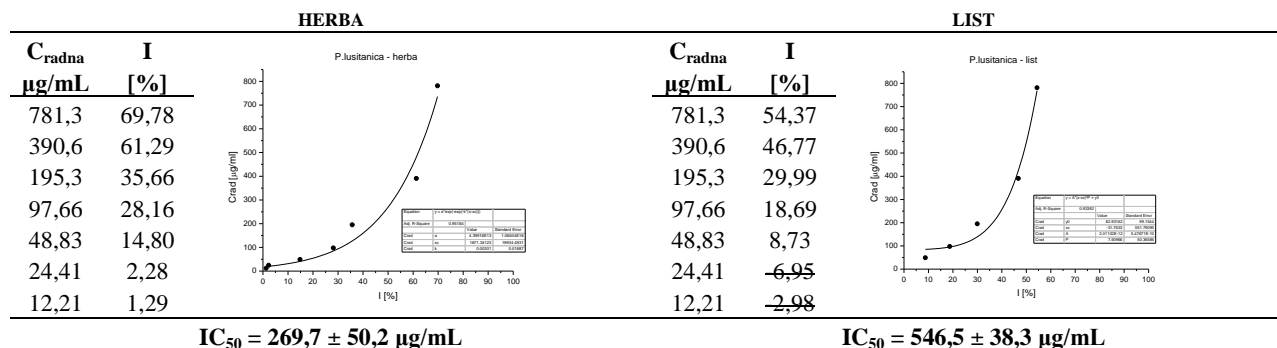
*P. judaica*1



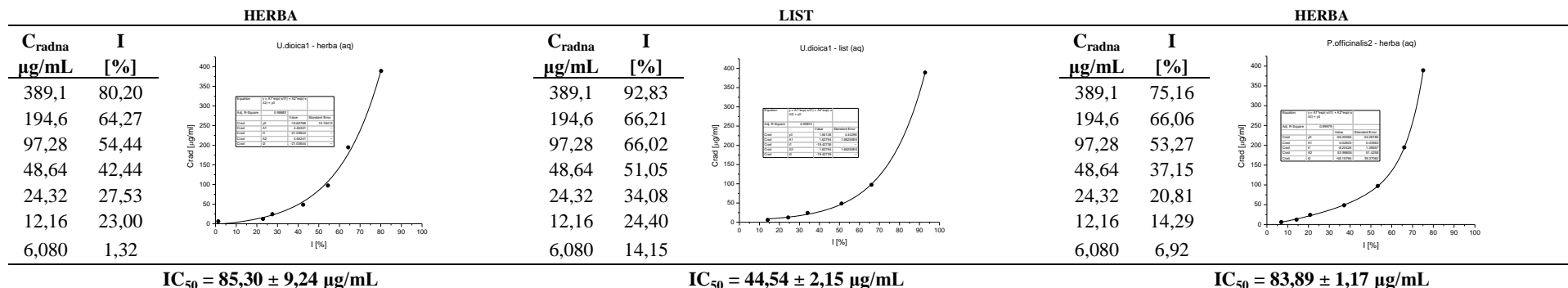
*P. judaica*2



P. lusitanica1



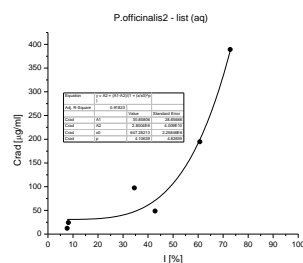
U. dio1 (pub) - infuz



*P. officinalis*2 - infuz

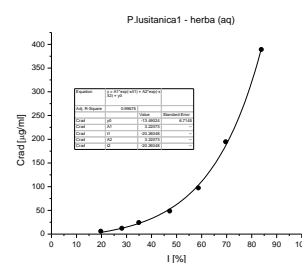
LIST

C _{radna} μg/mL	I [%]
389,1	72,84
194,6	60,69
97,28	34,52
48,64	42,80
24,32	8,19
12,16	7,67
6,080	9,11

 $IC_{50} = 106,8 \pm 26,1 \mu\text{g/mL}$ *P. lusitana*1 - infuz

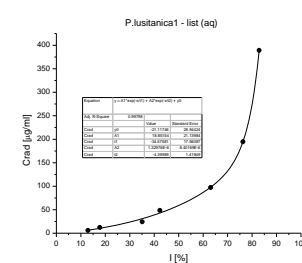
HERBA

C _{radna} μg/mL	I [%]
389,1	83,87
194,6	69,63
97,28	58,70
48,64	47,24
24,32	34,90
12,16	28,13
6,080	29,73

 $IC_{50} = 62,50 \pm 4,59 \mu\text{g/mL}$

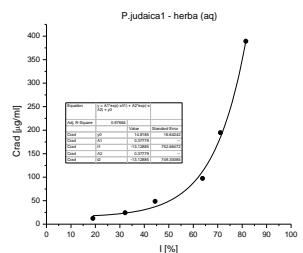
LIST

C _{radna} μg/mL	I [%]
389,1	82,91
194,6	76,24
97,28	63,08
48,64	42,33
24,32	35,10
12,16	17,76
6,080	12,89

 $IC_{50} = 59,05 \pm 3,62 \mu\text{g/mL}$ *P. judaica*1

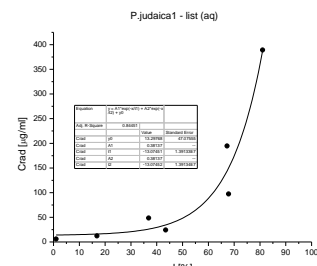
HERBA

C _{radna} μg/mL	I [%]
389,1	81,51
194,6	71,11
97,28	63,79
48,64	44,43
24,32	32,15
12,16	18,97
6,080	26,50

 $IC_{50} = 48,88 \pm 9,86 \mu\text{g/mL}$

LIST

C _{radna} μg/mL	I [%]
389,1	81,01
194,6	67,23
97,28	67,83
48,64	36,85
24,32	43,44
12,16	16,85
6,080	1,00

 $IC_{50} = 48,23 \pm 13,77 \mu\text{g/mL}$ *Sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije*

U. dioica5 (dio)

HERBA		KOREN		LIST	
C_{radna} µg/mL	I [%]	C_{radna} µg/mL	I [%]	C_{radna} µg/mL	I [%]
304,2	61,73	304,2	62,55	304,2	65,64
152,1	49,62	152,1	50,72	152,1	56,43
76,05	38,00	76,05	38,36	76,05	42,18
38,02	28,64	38,02	34,39	38,02	37,81
19,01	28,45	19,01	19,28	19,01	27,93
9,506	23,05	9,506	17,70	9,506	20,00
4,753	19,49	4,753	12,16	4,753	12,73

IC₅₀ = 158,4 ± 5,90 µg/mL

IC₅₀ = 143,7 ± 6,86 µg/mL

IC₅₀ = 103,4 ± 8,05 µg/mL

U. dioica7 (dio)

HERBA		KOREN		LIST	
C_{radna} µg/mL	I [%]	C_{radna} µg/mL	I [%]	C_{radna} µg/mL	I [%]
380,2	65,40	380,2	55,20	380,2	63,42
190,1	47,75	190,1	38,79	190,1	57,95
95,06	33,38	95,06	31,10	95,06	36,09
47,53	58,75	47,53	38,05	47,53	37,08
23,76	28,51	23,76	16,72	23,76	43,18
11,88	20,84	11,88	14,19	11,88	29,65

IC₅₀ = 211,4 ± 14,92 µg/mL

IC₅₀ = 305,7 ± 10,41 µg/mL

IC₅₀ = 138,7 ± 44,61 µg/mL

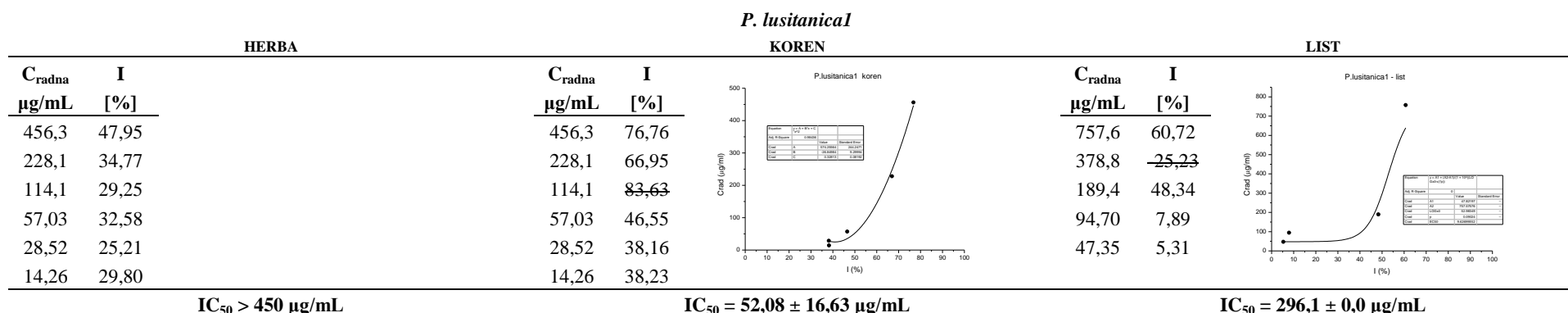
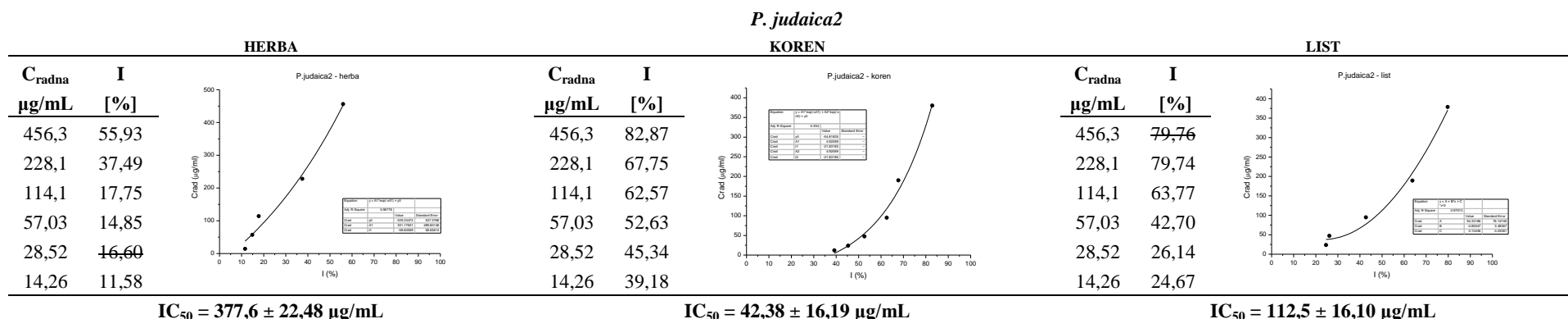
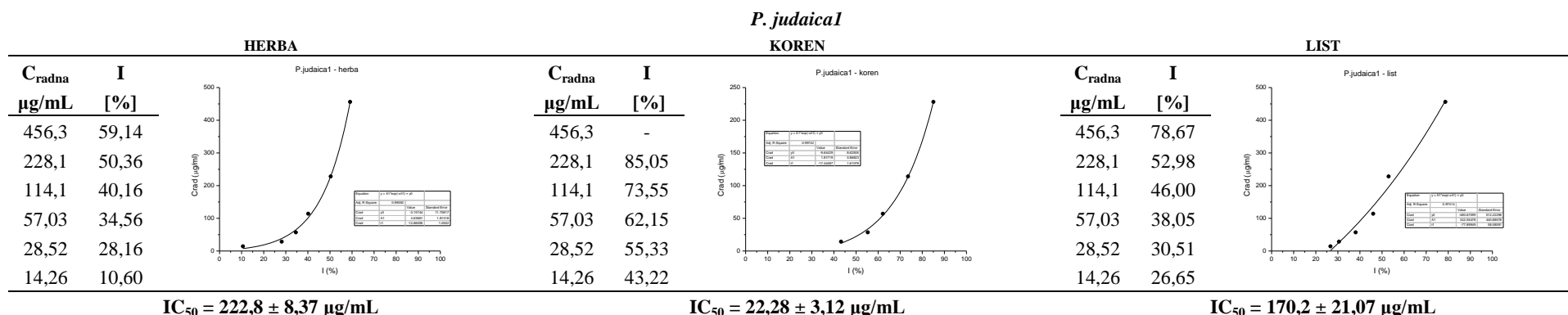
U. dioica8 (pub)

HERBA		KOREN		LIST	
C_{radna} µg/mL	I [%]	C_{radna} µg/mL	I [%]	C_{radna} µg/mL	I [%]
380,2	64,58	380,2	63,20	380,2	68,72
190,1	44,61	190,1	40,63	190,1	47,70
95,06	38,11	95,06	29,23	95,06	32,43
47,53	28,31	47,53	17,72	47,53	24,71
23,76	22,12	23,76	6,59	23,76	17,91
11,88	15,13	11,88	4,25	11,88	11,37

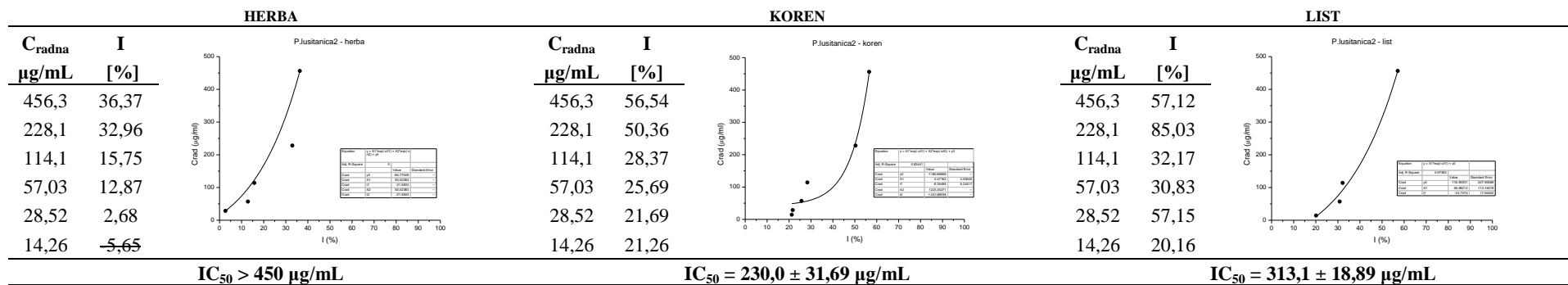
IC₅₀ = 229,0 ± 11,15 µg/mL

IC₅₀ = 253,3 ± 8,40 µg/mL

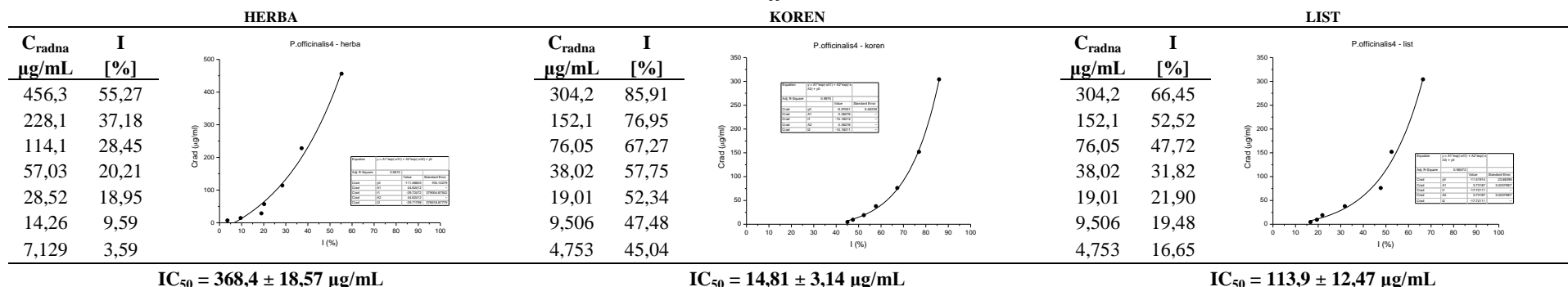
IC₅₀ = 207,3 ± 3,86 µg/mL



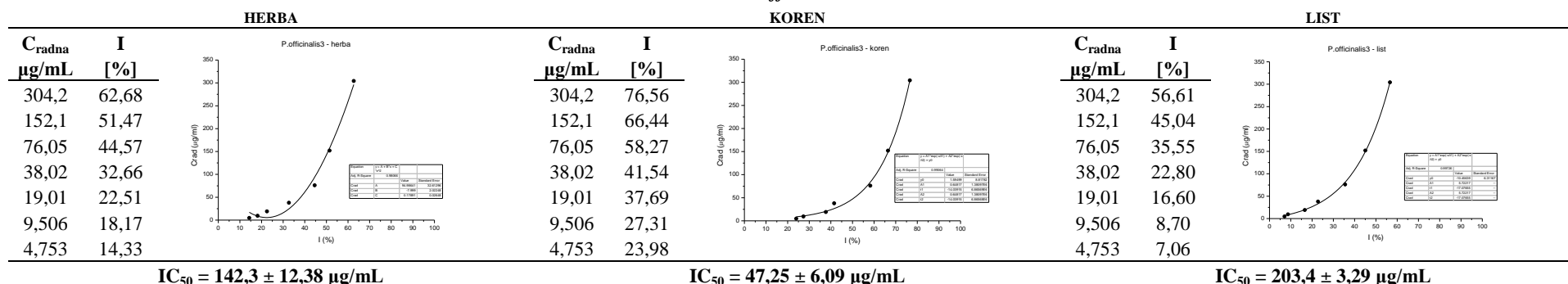
P. lusitanica2



P. officinalis4



P. officinalis3



*P. officinalis*2

P. serbica

KOREN		LIST		HERBA	
C _{radna} μg/mL	I [%]	C _{radna} μg/mL	I [%]	C _{radna} μg/mL	I [%]
152,1	76,42	304,2	61,66	456,3	40,94
76,05	63,52	152,1	44,48	228,1	30,09
38,02	57,21	76,05	32,91	114,1	19,26
19,01	38,09	38,02	25,57	57,03	11,41
9,506	27,25	19,01	11,53	28,52	2,93
3,169	27,12	9,506	11,30	14,26	-2,22
1,056	14,12	4,753	2,64		
IC₅₀ = 30,03 ± 5,36 μg/mL		IC₅₀ = 183,6 ± 7,44 μg/mL		IC₅₀ > 450 μg/mL	

*P. officinalis*1

STANDARDI
KVERCETIN

HERBA		KOREN		STANDARDI KVERCETIN	
C _{radna} μg/mL	I [%]	C _{radna} μg/mL	I [%]	C _{radna} μg/mL	I [%]
304,2	61,37	304,2	82,35	6,962	54,19
152,1	41,97	152,1	67,75	3,481	48,00
76,05	30,55	76,05	57,52	1,740	41,30
38,02	22,24	38,02	43,60	0,870	36,76
19,01	19,86	19,01	37,21	0,435	18,45
9,506	15,07	9,506	25,02		
4,753	15,21	4,753	26,58		
IC₅₀ = 206,8 ± 2,84 μg/mL		IC₅₀ = 52,46 ± 4,88 μg/mL		IC₅₀ = 4,295 ± 0,119 μg/mL	

STANDARDI

BHT		PG		BHA	
C _{radna} μg/mL	I [%]	C _{radna} μg/mL	I [%]	C _{radna} μg/mL	I [%]
1,688	67,04	17,49	55,72	2,327	74,21
0,844	58,09	8,745	51,47	1,163	67,27
0,422	38,58	4,373	44,68	0,582	58,91
0,211	28,29	2,186	43,26	0,291	48,73
0,106	21,51	1,093	41,11	0,145	43,60
IC₅₀ = 0,546 ± 0,076 μg/mL		IC₅₀ = 7,379 ± 0,732 μg/mL		IC₅₀ = 0,277 ± 0,033 μg/mL	

Ukupni redukcionni kapacitet – FRAP test

Tabela 8.24. Podaci za konstrukciju kalibracione krive standardnog rastvora askorbinske kisline (AA).

C _{radna} [µg/mL]	A (593 nm)			A _{srednje}	A _{korekcija}	A _{sr} -A _{kor}
4,955	0,966	1,172	1,137	1,092	0,049	1,043
4,129	0,788	0,972	0,963	0,908	0,045	0,863
3,303	0,679	0,819	0,823	0,774	0,043	0,730
2,642	0,573	0,661	0,676	0,637	0,051	0,586
1,981	0,447	0,527	0,527	0,500	0,044	0,456
1,323	0,324	0,376	0,374	0,358	0,045	0,313
0,661	0,230	0,248	0,247	0,242	0,047	0,195
0,331	0,163	0,179	0,178	0,173	0,044	0,130
0,165	0,138	0,143	0,139	0,140	0,042	0,098
0,083	0,122	0,127	0,122	0,124	0,043	0,081
0,000	0,105	0,103	0,105	0,104	0,045	0,059

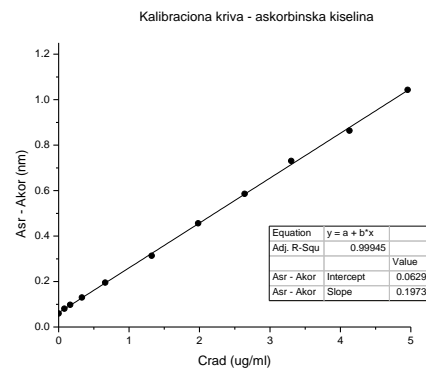


Tabela 8.25. Očitane apsorbancije za tri koncentracije ispitivanih ekstrakata i rezultati ukupnog redukcionog kapaciteta izraženog kao mg ekvivalenata askorbinske kisline po 1g suvog ekstrakta (mg eqAA/1g SE).

	Cradna (µg/ml)	HERBA			KOREN			LIST			
		C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	
<i>U. dio1 (pub)</i>	Cradna (µg/ml)	322,6	161,3	80,65	322,6	161,3	80,65	322,6	161,3	80,65	
	Asr	1,838	1,027	0,589	1,563	0,921	0,574	2,961	1,693	1,027	
	Akor	0,049	0,043	0,041	0,067	0,053	0,048	0,050	0,045	0,041	
	Asr-Akor	1,789	0,984	0,548	1,496	0,868	0,526	2,911	1,648	0,987	
	µg/mL AA sa kal, k,		4,667	2,457		4,080	2,346			4,680	
	mg ekv AA/1g SE		28,93	30,46		25,30	29,10				
		29,70 ± 1,08			27,20 ± 2,69			4,68 ± 0,00			
<i>U. dio3 (pub)</i>	Cradna (µg/ml)	129,0	64,52	32,26	258,1	129,0	64,52				
	Asr	1,468	0,835	0,501	1,223	0,744	0,466				
	Akor	0,038	0,036	0,036	0,050	0,044	0,041				
	Asr-Akor	1,430	0,798	0,465	1,173	0,700	0,425				
	µg/mL AA sa kal, k,	6,202	3,27	1,725	5,010	2,815	1,539				
	mg ekv AA/1g SE	48,07	50,69	53,48	19,41	21,82	23,85				
		50,74 ± 2,71			21,69 ± 2,22						
<i>U. dio4 (pub)</i>	Cradna (µg/ml)	322,6	161,3	80,65	322,6	161,3	80,65	322,6	161,3	80,65	
	Asr	2,172	1,189	0,687	1,585	0,926	0,561	1,910	1,033	0,613	
	Akor	0,044	0,041	0,038	0,072	0,050	0,052	0,050	0,044	0,043	
	Asr-Akor	2,128	1,148	0,649	1,513	0,875	0,509	1,860	0,989	0,570	
	µg/mL AA sa kal, k,			2,968		4,117	2,262		4,693	2,569	
	mg ekv AA/1g SE			36,80		25,52	28,05		29,10	31,86	
		36,80 ± 0,00			26,79 ± 1,79			30,48 ± 1,95			
<i>U. dio5 (dio)</i>	Cradna (µg/ml)	322,6	161,3	80,65	322,6	161,3	80,65	32,3	16,1	8,06	
	Asr	3,164	1,903	1,061	1,412	0,893	0,547	0,594	0,378	0,271	
	Akor	0,047	0,045	0,043	0,064	0,053	0,046	0,049	0,045	0,046	
	Asr-Akor	3,117	1,859	1,019	1,348	0,840	0,501	0,546	0,332	0,226	
	µg/mL AA sa kal, k,			4,842		3,936	2,218		2,447	1,365	0,826
	mg ekv AA/1g SE			60,05		24,41	27,51		75,84	84,60	102,4
		60,05 ± 0,00			25,96 ± 2,19			87,62 ± 13,55			
<i>U. dio6 (pub)</i>	Cradna (µg/ml)	129,0	64,52	32,26	258,1	129,0	64,52	129,0	64,52	32,26	
	Asr	1,788	1,017	0,596	1,332	0,794	0,496	2,278	1,261	0,728	
	Akor	0,039	0,037	0,035	0,056	0,045	0,040	0,039	0,035	0,035	
	Asr-Akor	1,749	0,980	0,561	1,276	0,750	0,456	2,239	1,226	0,693	
	µg/mL AA sa kal, k,	7,682	4,114	2,17	5,488	3,047	1,683	9,956	5,256	2,783	
	mg ekv AA/1g SE	59,54	63,77	67,27	21,27	23,61	26,09	77,16	81,47	86,27	
		63,52 ± 3,87			23,66 ± 2,41			81,63 ± 4,56			

		HERBA			KOREN			LIST		
		C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
<i>U. dio7 (dio)</i>	Cradna (µg/ml)	129,0	64,52	32,26	258,1	129,0	64,52	129,0	64,52	32,26
	Asr	1,407	0,820	0,430	1,169	0,685	0,439	1,198	0,702	0,424
	Akor	0,036	0,036	0,035	0,055	0,042	0,038	0,038	0,037	0,036
	Asr-Akor	1,371	0,784	0,394	1,114	0,642	0,401	1,161	0,665	0,388
	µg/mL AA sa kal, k,	5,928	3,205	1,396	4,736	2,546	1,428	4,954	2,653	1,367
	mg ekv AA/1g SE	45,94	49,68	43,28	18,35	19,73	22,13	38,39	41,12	42,38
			46,30 ± 3,22			20,07 ± 1,91			40,63 ± 2,04	
<i>U. dio8 (pub)</i>	Cradna (µg/ml)	129,0	64,52	32,26	258,1	129,0	64,52	129,0	64,52	32,26
	Asr	1,747	1,001	0,578	1,216	0,738	0,398	2,406	1,334	0,754
	Akor	0,039	0,036	0,045	0,056	0,046	0,037	0,037	0,035	0,036
	Asr-Akor	1,708	0,965	0,533	1,160	0,692	0,361	2,368	1,299	0,718
	µg/mL AA sa kal, k,	7,492	4,045	2,04	4,949	2,778	1,242	10,5500	5,594	2,899
	mg ekv AA/1g SE	58,06	62,70	63,24	19,18	21,53	19,25	81,76	86,71	89,87
			61,33 ± 2,85			19,99 ± 1,34			86,11 ± 4,09	
<i>U. kioviensis</i>	Cradna (µg/ml)	32,26	16,13	8,065	129,0	64,52	32,26	32,26	16,13	8,065
	Asr	1,132	0,717	0,454	0,652	0,443	0,348	1,217	0,755	0,538
	Akor	0,072	0,064	0,060	0,054	0,046	0,045	0,051	0,062	0,061
	Asr-Akor	1,060	0,653	0,394	0,598	0,396	0,304	1,166	0,693	0,477
	µg/mL AA sa kal, k,	4,485	2,597	1,396	2,342	1,405	0,978	4,977	2,783	1,781
	mg ekv AA/1g SE	139,0	161,0	173,1	18,2	21,8	30,3	154,3	172,5	220,8
			167,0 ± 8,5			23,41 ± 6,25			163,4 ± 12,9	
<i>P. serbica - herba</i>										
<i>P. officinalis1</i>	Cradna (µg/ml)	322,6	161,3	80,65	32,26	16,13	8,065	129,0	64,52	32,26
	Asr	1,677	0,915	0,609	0,514	0,348	0,266	0,416	0,276	0,203
	Akor	0,043	0,042	0,040	0,045	0,045	0,044	0,040	0,034	0,037
	Asr-Akor	1,633	0,872	0,569	0,469	0,303	0,223	0,376	0,242	0,166
	µg/mL AA sa kal, k,		4,102	2,566	2,058	1,217	0,809	1,312	0,69	0,338
	mg ekv AA/1g SE		25,43	31,82	63,80	75,45	100,4	10,17	10,70	10,48
			28,63 ± 4,52			79,87 ± 18,68			10,45 ± 0,26	
<i>P. officinalis2</i>	Cradna (µg/ml)	322,6	161,3	80,65	32,26	16,13	8,065	322,6	161,3	80,65
	Asr	1,649	0,885	0,533	1,181	0,711	0,519	0,877	0,532	0,339
	Akor	0,049	0,042	0,042	0,047	0,044	0,048	0,043	0,041	0,040
	Asr-Akor	1,601	0,843	0,491	1,134	0,667	0,471	0,834	0,490	0,299
	µg/mL AA sa kal, k,		3,952	2,169	5,426	3,061	2,069	3,906	2,165	1,198
	mg ekv AA/1g SE		24,50	26,89	168,2	189,8	256,5	12,11	13,42	14,85
			25,69 ± 1,69			179,0 ± 15,2			13,46 ± 1,37	
<i>P. officinalis3</i>	Cradna (µg/ml)	322,6	161,3	80,65	322,6	161,3	80,65	322,6	161,3	80,65
	Asr	1,243	0,749	0,453	2,212	1,396	0,878	2,537	1,259	0,902
	Akor	0,049	0,040	0,040	0,055	0,045	0,042	0,041	0,041	0,039
	Asr-Akor	1,193	0,709	0,413	2,157	1,351	0,836	2,496	1,218	0,863
	µg/mL AA sa kal, k,		3,273	1,7725			3,9178			4,0549
	mg ekv AA/1g SE		20,29	21,98			48,58			50,28
			21,14 ± 1,19			48,58 ± 0,00			50,28 ± 0,00	
<i>P. officinalis4</i>	Cradna (µg/ml)	322,6	161,3	80,65	32,26	16,13	8,065	322,6	161,3	80,65
	Asr	0,689	0,392	0,644	0,636	0,401	0,275	2,177	1,228	0,705
	Akor	0,044	0,042	0,041	0,046	0,048	0,044	0,045	0,044	0,042
	Asr-Akor	0,645	0,350	0,604	0,590	0,352	0,231	2,132	1,184	0,664
	µg/mL AA sa kal, k,	2,949	1,455	2,739	2,670	1,466	0,849			3,044
	mg ekv AA/1g SE	9,143	9,019	33,96	82,8	90,9	105,3			37,74
			9,08 ± 0,09			92,99 ± 11,42			37,74 ± 0,00	
<i>P. judaica1</i>	Cradna (µg/ml)	129,0	64,52	32,26	64,52	32,26	16,13	129,0	64,52	32,26
	Asr	1,631	0,919	0,546	2,054	1,230	0,746	1,726	0,913	0,550
	Akor	0,039	0,040	0,035	0,044	0,041	0,044	0,037	0,036	0,037
	Asr-Akor	1,593	0,879	0,511	2,010	1,189	0,702	1,689	0,877	0,514
	µg/mL AA sa kal, k,	6,958	3,646	1,938	8,893	5,084	2,825	7,4040	3,636	1,952
	mg ekv AA/1g SE	53,92	56,51	60,08	137,8	157,6	175,2	57,38	56,36	60,51
			9,08 ± 0,09			92,99 ± 11,42			37,74 ± 0,00	

		HERBA			KOREN			LIST		
		C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
		56,84 ± 3,09			147,7 ± 13,9			58,08 ± 2,16		
<i>P. judaica</i> 2	Cradna (µg/ml)	129,0	64,52	32,26	64,52	32,26	16,13	129,0	64,52	32,26
	Asr	1,562	0,885	0,432	1,757	1,067	0,642	1,327	0,747	0,475
	Akor	0,041	0,034	0,034	0,047	0,045	0,042	0,061	0,058	0,048
	Asr-Akor	1,521	0,851	0,398	1,709	1,022	0,600	1,266	0,689	0,427
	µg/mL AA sa kal, k,	6,624	3,516	1,414	7,497	4,309	2,351	5,441	2,764	1,549
	mg ekv AA/1g SE	51,34	54,50	43,83	116,2	133,6	145,8	42,17	42,84	48,02
			49,89 ± 5,48			139,7 ± 8,6			44,34 ± 3,20	
<i>P. lusitanica</i> 1	Cradna (µg/ml)	129,0	64,52	32,26	64,52	32,26	16,13	129,0	64,52	32,26
	Asr	1,261	0,737	0,448	2,034	1,212	0,601	1,395	0,801	0,495
	Akor	0,042	0,040	0,041	0,044	0,043	0,041	0,046	0,044	0,042
	Asr-Akor	1,219	0,697	0,407	1,990	1,170	0,560	1,349	0,758	0,453
	µg/mL AA sa kal, k,	5,223	2,801	1,456	8,800	4,996	2,166	5,8260	3,084	1,669
	mg ekv AA/1g SE	40,48	43,42	45,14	136,4	154,9	134,3	45,15	47,80	51,74
			43,01 ± 2,36			141,9 ± 11,3			48,23 ± 3,31	
<i>P. lusitanica</i> 2	Cradna (µg/ml)	129,0	64,52	32,26	64,52	32,26	16,13	129,0	64,52	32,26
	Asr	0,274	0,214	0,177	0,930	0,542	0,360	0,316	0,230	0,176
	Akor	0,043	0,041	0,041	0,043	0,044	0,043	0,057	0,050	0,045
	Asr-Akor	0,231	0,173	0,136	0,887	0,499	0,317	0,258	0,180	0,130
	µg/mL AA sa kal, k,	0,639	0,37	0,199	3,683	1,883	1,038	0,764	0,403	0,171
	mg ekv AA/1g SE	4,95	5,74	6,17	57,09	58,37	64,36	5,92	6,25	5,30
			5,62 ± 0,62			59,94 ± 3,88			5,82 ± 0,48	
INFUZI - VODENI EKSTRAKTI										
<i>U. dio</i> 1 (pub)	Cradna (µg/ml)	64,52	32,26	16,13	64,52	32,26	16,13	64,52	32,26	16,13
	Asr	0,607	0,359	0,225	0,333	0,215	0,152	0,969	0,575	0,340
	Akor	0,046	0,042	0,043	0,046	0,044	0,043	0,052	0,046	0,045
	Asr-Akor	0,562	0,317	0,183	0,287	0,171	0,108	0,918	0,529	0,295
	µg/mL AA sa kal, k,	2,204	1,149	0,573	1,020	0,521	0,25	3,7360	2,062	1,055
	mg ekv AA/1g SE	34,16	35,62	35,53	15,81	16,15	15,50	57,91	63,92	65,41
			35,10 ± 0,82			15,82 ± 0,33			62,41 ± 3,97	
<i>P. judaica</i> 1	Cradna (µg/ml)	64,52	32,26	16,13	64,52	32,26	16,13	64,52	32,26	16,13
	Asr	0,804	0,473	0,279	0,845	0,506	0,307	0,770	0,459	0,283
	Akor	0,045	0,044	0,045	0,043	0,080	0,043	0,045	0,046	0,042
	Asr-Akor	0,759	0,430	0,234	0,803	0,426	0,263	0,725	0,413	0,241
	µg/mL AA sa kal, k,	3,051	1,636	0,792	3,241	1,618	0,917	2,905	1,562	0,822
	mg ekv AA/1g SE	47,29	50,72	49,10	50,24	50,16	56,85	45,03	48,42	50,96
			49,04 ± 1,71			52,42 ± 3,84			48,14 ± 2,98	
<i>P. lusitanica</i> 1	Cradna (µg/ml)	64,52	32,26	16,13				64,52	32,26	16,13
	Asr	0,521	0,311	0,205				0,583	0,361	0,232
	Akor	0,044	0,043	0,039				0,046	0,042	0,040
	Asr-Akor	0,477	0,268	0,166				0,537	0,319	0,192
	µg/mL AA sa kal, k,	1,838	0,938	0,5				2,096	1,158	0,611
	mg ekv AA/1g SE	28,49	29,08	31,00				32,49	35,90	37,88
			29,52 ± 1,31						35,42 ± 2,73	
<i>P. officinalis</i> 2	Cradna (µg/ml)	64,52	32,26	16,13				64,52	32,26	16,13
	Asr	0,498	0,295	0,204				0,347	0,209	0,146
	Akor	0,041	0,043	0,069				0,040	0,038	0,037
	Asr-Akor	0,457	0,252	0,135				0,307	0,171	0,109
	µg/mL AA sa kal, k,	1,752	0,87	0,366				1,106	0,521	0,254
	mg ekv AA/1g SE	27,16	26,97	22,69				17,14	16,15	15,75
			25,61 ± 2,53						16,35 ± 0,72	

8.7. ANTIINFLAMATORNI POTENCIJAL EKSTRAKATA

Tabela 8.26. Vrednosti inhibicije [%] produkcije četiti ispitivana metabolita arahidonske kiseline pri različitim koncentracijama ekstrakata i određene IC₅₀ vrednosti,

<i>U. dioica1 (pub) - herba</i>				
C _{radna} [mg/mL]	I [%]			
	12-HHT	12-HETE	PGE ₂	TXB ₂
11,76	102,3	106,9	29,5	97,4
8,00	72,2	74,5	-150,3	76,9
4,00	53,0	67,8	-94,2	40,1
2,00	29,1	62,6	-65,6	11,4
1,00	20,3	43,0	-39,3	0,8
0,50	5,0	5,5	-0,6	-8,4
IC₅₀ [mg/mL]	4,22	1,92	>12	4,99

<i>U. dioica1 (pub) - koren</i>				
C _{radna} [mg/mL]	I [%]			
	12-HHT	12-HETE	PGE ₂	TXB ₂
11,76	99,5	98,4	87,4	100,2
8,00	100,5	54,8	50,8	99,6
4,00	83,4	-25,2	143,9	86,0
2,00	53,4	22,3	-100,3	54,9
1,00	31,1	-4,8	23,0	30,2
0,04	2,9	5,2	12,9	4,5
IC₅₀ [mg/mL]	1,73	8,04	7,98	1,68

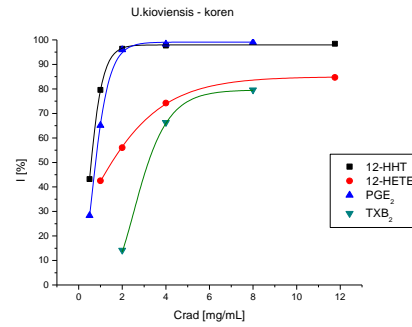
<i>U. dioica6 (pub) - herba</i>				
C _{radna} [mg/mL]	I [%]			
	12-HHT	12-HETE	PGE ₂	TXB ₂
11,76	88,8	79,5	26,8	94,3
8,00	72,6	78,3	-19,7	71,2
4,00	57,9	71,6	-8,5	52,1
2,00	45,2	63,3	12,5	39,1
1,00	52,5	67,0	9,4	28,9
0,50	19,8	5,2	19,1	10,8
IC₅₀ [mg/mL]	2,82	1,70	>12	3,95

<i>U. dioica6 (pub) - koren</i>				
C _{radna} [mg/mL]	I [%]			
	12-HHT	12-HETE	PGE ₂	TXB ₂
11,76	99,4	98,2	100,2	99,6
8,00	100,7	83,7	85,6	100,4
4,00	80,2	42,2	43,3	77,7
2,00	40,6	-11,0	32,5	35,5
1,00	36,5	-0,1	14,2	19,8
0,04	20,9	22,7	3,6	-2,0
IC₅₀ [mg/mL]	1,89	5,63	6,71	2,40

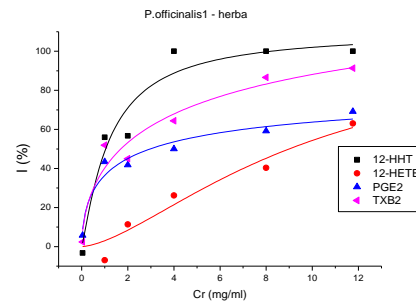
<i>U. kioviensis - herba</i>				
C _{radna} [mg/mL]	I [%]			
	12-HHT	12-HETE	PGE ₂	TXB ₂
11,76	28,5	79,2	-198,9	29,2
8,00	3,2	72,3	-230,7	5,8
4,00	13,3	71,6	-114,7	25,1
2,00	-19,1	49,6	-152,1	-12,0
1,00	-26,4	35,5	-85,2	1,0
0,50	13,9	1,8	11,9	4,6
IC₅₀ [mg/mL]	>12	2,68	>12	>12

U. kioviensis - koren

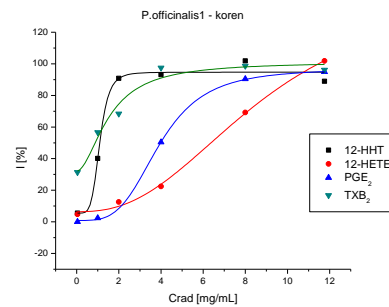
C_{radna} [mg/mL]	I [%]			
	12-HHT	12-HETE	PGE ₂	TXB ₂
11,76	98,4	84,7	101,2	150,8
8,00	101,4	106,2	99,0	79,6
4,00	97,7	74,2	98,3	66,3
2,00	96,4	56,0	96,0	14,2
1,00	79,6	42,5	65,1	70,8
0,50	43,2	100,8	28,3	100,0
IC₅₀ [mg/mL]	0,97	2,04	0,82	3,20

*P. officinalis1* - herba

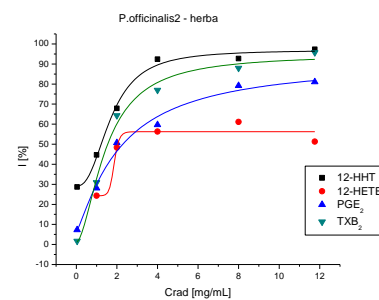
C_{radna} [mg/mL]	I [%]			
	12-HHT	12-HETE	PGE ₂	TXB ₂
11,76	100,0	41,7	74,4	90,1
8,00	59,0	18,6	59,9	86,2
4,00	67,5	37,4	43,0	56,1
2,00	60,1	1,1	35,7	36,4
1,00	31,9	5,2	42,2	46,7
0,04	37,4	44,6	4,1	0,0
IC₅₀ [mg/mL]	1,57	>12	4,04	2,60

*P. officinalis1* - koren

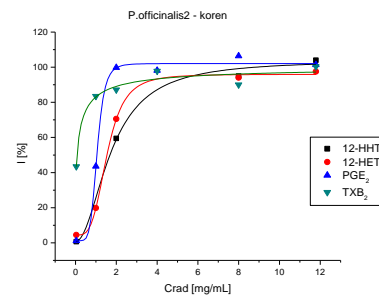
C_{radna} [mg/mL]	I [%]			
	12-HHT	12-HETE	PGE ₂	TXB ₂
11,76	88,9	101,9	94,9	96,1
8,00	101,8	69,2	90,4	98,7
4,00	93,1	22,4	50,4	97,5
2,00	90,8	12,6	14,4	68,4
1,00	40,1	13,4	2,4	56,7
0,04	5,5	4,8	0,0	31,4
IC₅₀ [mg/mL]	0,92	6,14	4,95	0,71

*P. officinalis2* - herba

C_{radna} [mg/mL]	I [%]			
	12-HHT	12-HETE	PGE ₂	TXB ₂
11,76	97,3	51,3	81,1	95,7
8,00	92,7	61,1	79,2	88,0
4,00	92,4	56,3	59,7	77,0
2,00	67,9	48,4	50,7	64,3
1,00	44,7	24,3	28,1	30,9
0,04	28,7	34,5	7,3	1,7
IC₅₀ [mg/mL]	0,96	3,43	2,21	1,58

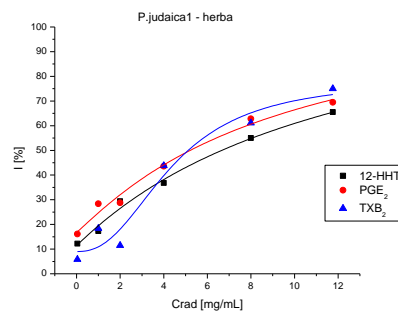
*P. officinalis2* - koren

C_{radna} [mg/mL]	I [%]			
	12-HHT	12-HETE	PGE ₂	TXB ₂
11,76	104,0	97,5	101,4	100,4
8,00	95,0	94,1	106,4	90,0
4,00	127,3	111,1	98,2	97,8
2,00	69,4	70,5	99,8	87,1
1,00	122,7	19,9	53,6	83,4
0,04	0,6	4,5	1,2	43,4
IC₅₀ [mg/mL]	0,08	1,32	0,84	0,43

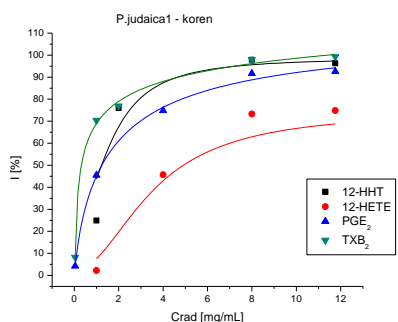


***P. judaica1* - herba**

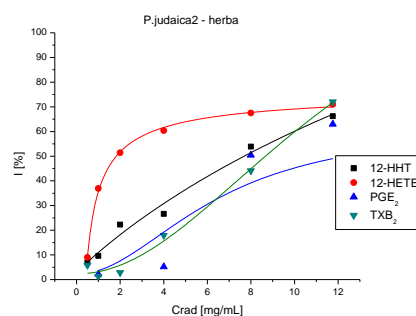
C_{radna} [mg/mL]	I [%]			
	12-HHT	12-HETE	PGE ₂	TXB ₂
11,76	65,5	1,8	69,5	75,0
8,00	55,0	13,3	62,8	61,1
4,00	36,8	10,6	43,6	43,8
2,00	29,4	9,0	28,8	11,5
1,00	17,3	-18,2	28,4	18,4
0,04	12,2	-10,7	16,1	5,8
IC₅₀ [mg/mL]	6,61	>12	4,23	5,92

***P. judaica1* - koren**

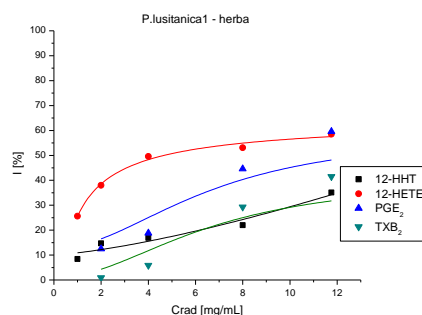
C_{radna} [mg/mL]	I [%]			
	12-HHT	12-HETE	PGE ₂	TXB ₂
11,76	96,3	74,8	92,6	99,3
8,00	97,9	73,3	91,7	98,0
4,00	106,3	45,7	74,8	104,6
2,00	76,0	-13,6	-2,1	76,9
1,00	24,9	-20,1	45,5	70,4
0,04	-6,9	5,3	4,2	8,2
IC₅₀ [mg/mL]	1,28	5,03	1,37	0,71

***P. judaica2* - herba**

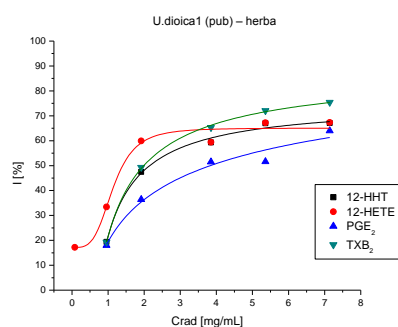
C_{radna} [mg/mL]	I [%]			
	12-HHT	12-HETE	PGE ₂	TXB ₂
11,76	66,2	71,0	63,0	72,0
8,00	53,9	67,5	50,4	44,1
4,00	26,6	60,4	5,2	17,9
2,00	22,3	51,4	-17,8	2,8
1,00	9,6	36,9	-3,9	1,3
0,50	6,9	9,0	12,2	5,8
IC₅₀ [mg/mL]	7,69	1,82	7,41	9,90

***P. lusitanica1* - herba**

C_{radna} [mg/mL]	I [%]			
	12-HHT	12-HETE	PGE ₂	TXB ₂
11,76	35,1	58,5	59,6	41,5
8,00	22,0	53,1	44,6	29,3
4,00	16,9	49,6	18,8	0,9
2,00	14,7	38,0	12,5	-6,1
1,00	8,4	25,6	30,2	-5,5
0,50	22,8	42,2	17,9	-9,7
IC₅₀ [mg/mL]	>12	5,82	10,1	>12

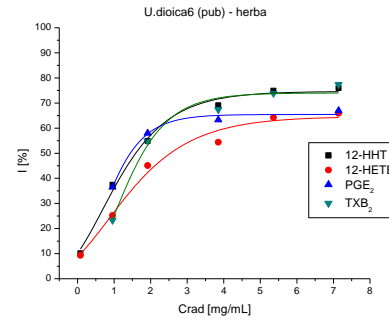
**INFUZI – VODENI EKSTRAKTI*****U. dioica1* (pub) – herba**

C_{radna} [mg/mL]	I [%]			
	12-HHT	12-HETE	PGE ₂	TXB ₂
7,14	67,1	67,3	64,0	75,4
5,36	67,0	67,2	51,6	72,1
3,85	59,3	59,4	51,5	65,3
1,92	47,5	59,9	36,4	49,3
0,96	19,4	33,4	18,0	19,3
0,08	-4,6	17,2	-17,8	-9,1
IC₅₀ [mg/mL]	2,45	1,67	3,31	2,21

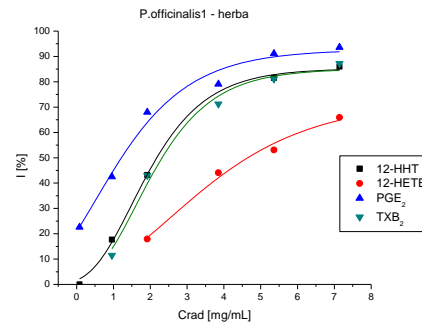


U. dioica6 (pub) – herba

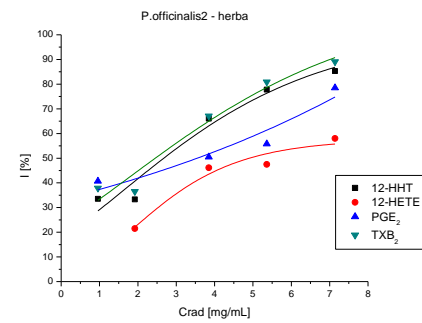
C_{radna} [mg/mL]	I [%]			
	12-HHT	12-HETE	PGE ₂	TXB ₂
7,14	76,0	65,9	67,0	77,4
5,36	74,9	64,2	50,5	73,9
3,85	69,1	54,4	63,3	67,4
1,92	54,9	45,1	58,0	54,8
0,96	37,4	25,2	36,5	23,3
0,08	10,1	9,3	-27,6	-4,5
IC₅₀ [mg/mL]	1,61	2,76	1,45	1,94

*P. officinalis1 – herba*

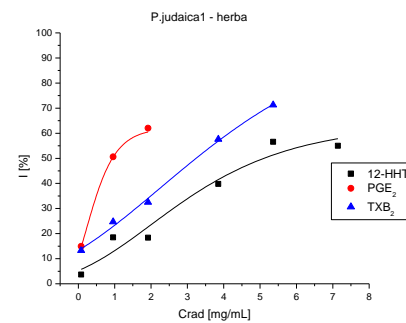
C_{radna} [mg/mL]	I [%]			
	12-HHT	12-HETE	PGE ₂	TXB ₂
7,14	86,0	65,9	93,6	87,2
5,36	81,5	53,1	91,1	81,1
3,85	72,8	44,1	79,1	71,2
1,92	43,2	17,9	68,0	43,0
0,96	17,7	-12,2	42,5	11,5
0,08	0,0	-38,9	22,6	-11,1
IC₅₀ [mg/mL]	2,32	4,54	1,15	2,41

*P. officinalis2 – herba*

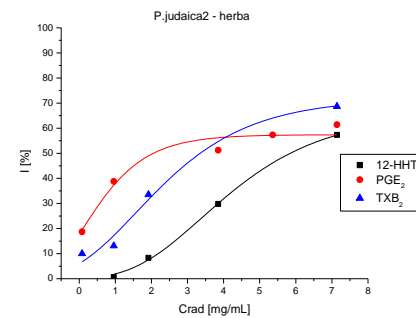
C_{radna} [mg/mL]	I [%]			
	12-HHT	12-HETE	PGE ₂	TXB ₂
7,14	85,3	58,0	78,5	89,1
5,36	77,8	47,5	55,8	80,9
3,85	66,0	46,1	50,5	67,1
1,92	33,3	21,5	63,6	36,5
0,96	33,5	33,7	40,7	37,9
0,08	-	-	-	-
IC₅₀ [mg/mL]	2,63	5,40	4,17	1,98

*P. judaica1 – herba*

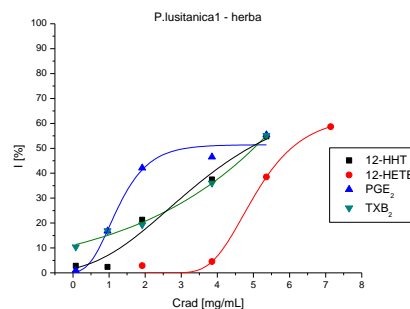
C_{radna} [mg/mL]	I [%]			
	12-HHT	12-HETE	PGE ₂	TXB ₂
7,14	55,0	21,4	61,4	68,4
5,36	56,6	26,7	50,0	71,3
3,85	39,8	22,2	57,5	57,6
1,92	18,4	2,7	62,0	32,5
0,96	18,5	13,0	50,6	24,7
0,08	3,7	3,4	14,9	13,3
IC₅₀ [mg/mL]	5,36	>8	0,84	3,15

*P. judaica2 – herba*

C_{radna} [mg/mL]	I [%]			
	12-HHT	12-HETE	PGE ₂	TXB ₂
7,14	57,3	-4,1	61,4	68,7
5,36	62,2	14,8	57,3	73,4
3,85	29,8	10,7	51,2	29,0
1,92	8,3	-2,1	54,8	33,5
0,96	0,6	1,1	38,8	13,1
0,08	-6,5	-0,6	18,7	10,0
IC₅₀ [mg/mL]	5,51	>8	1,79	4,47



<i>P. lusitanica</i> - herba				
C_{radna} [mg/mL]	I [%]			
	12-HHT	12-HETE	PGE ₂	TXB ₂
7,14	109,8	58,7	107,9	104,4
5,36	54,8	38,5	55,4	55,2
3,85	37,5	4,5	46,5	36,0
1,92	21,3	2,9	42,1	19,3
0,96	2,4	-13,3	16,8	16,9
0,08	2,8	8,8	1,0	10,4
IC₅₀ [mg/mL]	4,85	6,58	4,18	4,76



8.8. INHIBICIJA ENZIMA ACETILHOLINESTERAZE

Tabela 8.27. Rezultati eksperimenta određivanja sposobnosti metanolnih ekstrakata herbi i korena vrsta roda *Urtica* da inhibiraju enzim acetilholinesterazu (RP – radna proba).

	HERBA				KOREN				
	RP1	RP2	RP3	A _{kon}	RP1	RP2	RP3	A _{kon}	
<i>U. dio1 (pub)</i>	1 min	0,037	0,024	0,041	0,335	0,059	0,026	0,041	0,335
	0 min	0,011	0,004	0,009	0,287	0,035	0,012	0,014	0,287
	ΔA_{1min}	0,026	0,020	0,032	0,048	0,023	0,015	0,026	0,048
	I (%)	45,26	57,41	32,76		51,08	69,78	45,35	
		45,14 ± 7,12				55,40 ± 7,38			
<i>U. dio3 (pub)</i>	1 min	0,046	0,029	0,026	0,255	0,043	0,022	0,021	0,255
	0 min	0,027	0,009	0,003	0,214	0,033	0,009	0,008	0,214
	ΔA_{1min}	0,020	0,020	0,023	0,040	0,010	0,014	0,014	0,040
	I (%)	50,26	49,16	42,25		75,26	66,22	65,91	
		47,23 ± 2,51				69,13 ± 3,07			
<i>U. dio4 (pub)</i>	1 min	0,042	0,032	0,025	0,385	0,037	0,025	0,026	0,385
	0 min	0,019	0,011	0,002	0,345	0,014	0,007	0,010	0,345
	ΔA_{1min}	0,023	0,021	0,023	0,040	0,022	0,018	0,017	0,040
	I (%)	43,27	47,17	42,18		44,13	53,86	57,78	
		44,21 ± 1,25				51,93 ± 4,06			
<i>U. dio5 (dio)</i>	1 min	0,007	0,030	-0,003	0,241	0,047	0,027	0,029	0,241
	0 min	-0,007	0,010	-0,017	0,206	0,033	0,012	0,012	0,206
	ΔA_{1min}	0,014	0,019	0,014	0,035	0,013	0,015	0,017	0,035
	I (%)	60,13	45,22	60,16		61,52	57,48	51,30	
		45,23 ± 0,00				56,76 ± 2,97			
<i>U. dio6 (pub)</i>	1 min	0,049	0,025	0,017	0,261	0,034	0,032	0,022	0,261
	0 min	0,031	0,010	-0,005	0,218	0,016	0,013	0,005	0,218
	ΔA_{1min}	0,018	0,015	0,021	0,043	0,017	0,018	0,016	0,043
	I (%)	57,83	64,74	50,63		60,17	57,39	61,72	
		61,29 ± 3,45				59,76 ± 1,27			
<i>U. dio8 (pub)</i>	1 min	0,028	0,023	0,030	0,213	0,050	0,023	0,027	0,213
	0 min	0,021	0,011	0,015	0,161	0,037	0,006	0,010	0,161
	ΔA_{1min}	0,007	0,013	0,015	0,052	0,014	0,017	0,018	0,052
	I (%)	86,25	75,19	71,40		73,44	67,68	66,14	
		77,62 ± 4,45				69,09 ± 2,22			
<i>U. kioviensis</i>	1 min	0,195	0,089	0,086	0,267	0,103	0,016	0,008	0,267
	0 min	0,188	0,094	0,068	0,213	0,101	0,012	0,000	0,213
	ΔA_{1min}	0,007	-0,005	0,018	0,055	0,003	0,004	0,007	0,055
	I (%)	87,15	109,11	66,55		95,05	93,35	86,96	
		76,85 ± 10,30				91,79 ± 2,46			

Tabela 8.28. Rezultati eksperimenta određivanja sposobnosti metanolnih ekstrakata herbi i korena vrsta roda *Parietaria* da inhibiraju enzim acetilholinesterazu (RP – radna proba).

		HERBA				KOREN			
		RP1	RP2	RP3	A _{kon}	RP1	RP2	RP3	A _{kon}
<i>P. officinalis</i> 1	1 min	0,059	0,043	0,036	0,181	0,041	0,023	0,017	0,181
	0 min	0,034	0,011	0,005	0,120	0,030	0,005	0,003	0,120
	ΔA_{1min}	0,025	0,031	0,032	0,062	0,011	0,017	0,013	0,062
	I (%)	59,35	49,26	49,00		82,51	71,89	78,26	
		52,54 ± 3,41				77,55 ± 3,09			
<i>P. officinalis</i> 2	1 min	0,071	0,044	0,041	0,173	0,060	0,018	0,003	0,173
	0 min	0,039	0,010	0,004	0,120	0,052	0,006	0,001	0,120
	ΔA_{1min}	0,032	0,035	0,036	0,053	0,009	0,012	0,002	0,053
	I (%)	40,50	34,78	31,72		83,86	77,87	95,65	
		35,67 ± 2,57				85,79 ± 5,23			
<i>P. officinalis</i> 3	1 min	0,071	0,046	0,050	0,176	0,038	0,028	0,021	0,176
	0 min	0,037	0,014	0,012	0,121	0,025	0,013	0,010	0,121
	ΔA_{1min}	0,034	0,033	0,037	0,055	0,013	0,015	0,012	0,055
	I (%)	37,77	40,70	32,20		76,90	72,51	78,78	
		36,89 ± 2,49				76,07 ± 1,86			
<i>P. officinalis</i> 4	1 min	0,066	0,035	0,033	0,188	0,049	0,021	0,015	0,188
	0 min	0,036	0,008	0,008	0,128	0,040	0,012	0,009	0,128
	ΔA_{1min}	0,030	0,027	0,025	0,060	0,010	0,009	0,006	0,060
	I (%)	50,37	55,22	58,55		84,14	85,34	89,68	
		54,71 ± 2,38				86,39 ± 1,68			
<i>P. judaica</i> 1	1 min	0,058	0,023	0,012	0,167	0,069	0,011	0,021	0,167
	0 min	0,047	0,011	0,000	0,114	0,067	0,008	0,016	0,114
	ΔA_{1min}	0,011	0,012	0,013	0,054	0,001	0,003	0,004	0,054
	I (%)	79,58	78,41	76,61		97,55	94,42	91,75	
		78,20 ± 0,86				94,57 ± 1,68			
<i>P. judaica</i> 2	1 min	0,062	0,023	0,013	0,151	0,047	0,025	0,017	0,151
	0 min	0,049	0,009	0,004	0,113	0,035	0,008	0,003	0,113
	ΔA_{1min}	0,013	0,015	0,017	0,038	0,012	0,016	0,014	0,038
	I (%)	66,98	61,24	54,90		68,98	56,79	62,15	
		64,11 ± 2,87				62,64 ± 3,53			
<i>P. lusitanica</i> 1	1 min	0,048	0,075	0,056	0,236				
	0 min	0,029	0,045	0,017	0,181				
	ΔA_{1min}	0,019	0,030	0,039	0,055				
	I (%)	64,92	46,11	29,82					
		44,70 ± 1,69							
<i>P. lusitanica</i> 2	1 min	0,069	0,043	0,034	0,169	0,020	0,013	0,007	0,236
	0 min	0,040	0,011	0,006	0,116	0,012	0,002	0,000	0,181
	ΔA_{1min}	0,029	0,032	0,029	0,054	0,009	0,011	0,007	0,055
	I (%)	46,10	41,34	46,65		84,44	80,42	86,95	
		46,95 ± 10,14				83,94 ± 1,90			

8.9. EKSPERIMENTI NA ĆELIJSKIM LINIJAMA IEC18 I Caco2

8.9.1. Određivanje toksičnosti ekstrakata prema IEC18 ćelijama merenjem aktivnosti enzima LDH

Tabela 8.29. Promena apsorbancije ($\lambda = 340 \text{ nm}$) u 1 minutu ($\Delta A/\text{min}$) proporcionalna aktivnosti LDH.

Crad [$\mu\text{g/mL}$]	<i>U,dioica6</i>		<i>P,officinalis2</i>		<i>P,judaica1</i>		<i>P,lusitana1</i>
	HERBA	KOREN	HERBA	KOREN	HERBA	KOREN	HERBA
0,10	0,0262	0,0298	0,0219	0,0212	0,0271	0,0262	0,0363
1,00	0,0311	0,0283	0,0357	0,0303	0,0326	0,0355	0,0286
10,0	0,0357	0,0339	0,0293	0,0355	0,0327	0,0310	0,0340
50,0	0,0378	0,0369	0,0345	0,0409	0,0383	0,0377	0,0361
100	0,0401	0,0307	0,0294	0,0452	0,0302	0,0317	0,0327
200	0,0317	0,0219	0,0289	0,0634	0,0286	0,0448	0,0345
kontrola	0,0289						
kon+DMSO	0,0307						

8.9.2. Kvantifikacija citokina rat MCP1 i GRO α u IEC18 ćelijama

Uticaoj ekstrakata na sekreciju citokina rat MCP1 i GRO α u bazalnim uslovima i uslovima LPS-stimulisanje inflamacije IEC18 ćelija

Tabela 8.30. Koncentracije i apsorbancije standardnih rastvora proteina rat MCP1 i GRO α za konstruisanje kalibracione krive.

rat MCP1		GRO α	
Crad [pg/ml]	A (450 nm)	Crad [pg/ml]	A (450 nm)
1000	0,901	1000	0,901
500	0,579	500	0,579
250	0,331	250	0,331
62,50	0,102	62,50	0,102
15,62	0,028	15,62	0,028
3,900	0,009	3,900	0,009
0,970	0,005	0,970	0,005

Apsorbancije standardnih rastvora proteina rat MCP1 i GRO α su očitane pomoću BIO RAD, 680 XR spektrofotometra, a kalibracione krive su konstruisane u povezanom softveru Microplate manager, ver 5.2.1. BIO RAD, Pomoću ovog spektrofotometra očitane su apsorbancije uzoraka i direktno iz softvera određena odgovarajuća koncentracija ovih proteina sa kalibracionih krivih (dato u naredne dve tabele).

Tabela 8.31. Rezultati određivanja koncentracije proteina rat MCP1 u uslovima sa i bez LPS-stimulisanе inflamacije IEC18 ćelija.

Uzorak	- LPS					+ LPS					
	Crad [µg/mL]	A (450 nm)	[pg/mL] sa kal.k.	[pg/mL]* u uzorku	C _{MCP1} ± SEM [pg/mL]	A (450 nm)	[pg/mL] sa kal.k.	[pg/mL]* u uzorku	C _{MCP1} ± SEM [pg/mL]		
kontrola	0	0,069 0,088	41,01 54,14	10252 13534	11893 ± 1641	0,451 0,478	236,6 253,7	118302 126860	122581 ± 4279		
<i>U. dioica</i> 	herba	10	0,063 0,107	36,96 67,68	9239 16919	13079 ± 3840	0,249 0,211	178,6 147,4	89280 73698	81489 ± 7791	
		10	0,053 0,064	30,33 37,63	7582 9407	8495 ± 913	0,222 0,25	156,3 179,4	78156 89697	83926 ± 5771	
	koren	1	0,062 0,076	36,29 45,79	9072 11448	10260 ± 1188	0,247 0,283	176,9 207,3	88447 103661	96054 ± 7607	
		10	0,116 0,134	74,22 87,52	18554 21880	20217 ± 1663	0,262 0,263	189,5 190,3	94729 95151	94940 ± 211	
	<i>P. officinalis</i> 	herba	10	0,078 0,078	47,17 47,17	11793 11793	11793 ± 0	0,472 0,570	249,9 314,8	124943 157406	141174 ± 16232
			10	0,070 0,068	41,69 40,33	10422 10082	10252 ± 170	0,541 0,542	295,1 295,7	147538 147875	147706 ± 169
		koren	1	0,063 0,067	36,96 39,65	9239 9913	9576 ± 337	0,439 0,486	229,1 258,9	114556 129430	121993 ± 7437
			50	0,155 0,138	103,4 90,52	25848 22629	24238 ± 1610	0,679 0,742	393,3 442,0	196643 221021	208832 ± 12189
			5	0,072 0,076	43,05 45,79	10762 11448	11105 ± 343	0,491 0,523	262,1 283,1	131044 141526	136285 ± 5241
			0,5	0,07 0,075	41,69 45,10	10422 11276	10849 ± 427	0,281 0,438	236,6 228,5	118298 114245	116271 ± 2027
<i>P. judaica</i> 	herba	10	0,073 0,075	43,73 45,10	10933 11276	11105 ± 171	0,436 0,524	227,2 283,7	113624 141858	127741 ± 14117	
		10	0,077 0,066	46,48 38,98	11620 9744	10682 ± 938	0,531 0,445	288,4 232,8	144187 116424	130306 ± 13882	
	koren	1	0,1 0,089	62,64 54,84	15661 13710	14685 ± 976	0,479 0,45	254,4 236,0	127180 117989	122584 ± 4596	
		50	0,182 0,148	124,3 98,06	31079 24515	27797 ± 3282	0,712 0,659	418,5 378,4	209246 189176	199211 ± 10035	
		5	0,062 0,07	36,29 41,69	9072 10422	9747 ± 675	0,486 0,429	258,9 222,9	129430 111459	120444 ± 8985	
		0,5	0,071 0,081	42,37 49,25	10592 12312	11452 ± 860	0,59 0,474	328,7 251,2	164346 125581	144963 ± 19383	
	<i>P. lusitanica</i> 	herba	10	0,086 0,107	52,73 67,68	13184 16919	15051 ± 1868	0,426 0,448	221,1 234,7	110535 117362	113949 ± 3414
			10	0,067 0,073	39,65 43,73	9913 10933	10423 ± 510	0,442 0,303	231,0 248,8	115489 124408	119948 ± 4460
		koren	1	0,073 0,081	43,73 49,25	10933 12312	11623 ± 689	0,508 0,481	273,2 255,6	136580 127822	132201 ± 4379

*koncentracija očitana sa kalibracione krive pomnožena sa faktorom razblaženja (-LPSx250; +LPSx500).

Tabela 8.32. Rezultati određivanja koncentracije proteina GRO α u uslovima sa i bez LPS-stimulisanе inflamacije IEC18 ćelija.

Uzorak	- LPS					+ LPS				
	Crad [$\mu\text{g/mL}$]	A (450 nm)	[pg/mL] sa kal.k.	[pg/mL]* u uzorku	C _{GROα} \pm SEM [pg/mL]	A (450 nm)	[pg/mL] sa kal.k.	[pg/mL]* u uzorku	C _{GROα} \pm SEM [pg/mL]	
kontrola	0	0,069 0,088	41,01 54,14	2050 2707	2379 \pm 328x	0,314 0,260	178,5 141,5	44613 35385	39999 \pm 4614	
<i>U. dioica</i> 6	herba	100	0,063	36,96	1848	3116 \pm 268	0,249	178,6	44640	40745 \pm 3896
			0,107	67,68	3384		0,211	147,4	36849	
		10	0,053	30,33	1516	1699 \pm 183	0,222	156,3	39078	41963 \pm 2885
			0,064	37,63	1881		0,250	179,4	44849	
	1	0,062	36,29	1814	2052 \pm 238	0,247	176,9	44223	48027 \pm 3804	
		0,076	45,79	2290		0,283	207,3	51831		
	koren	100	0,116	74,22	3711	4043 \pm 333	0,262	189,5	47365	47470 \pm 106
			0,134	87,52	4376		0,263	190,3	47576	
		10	0,078	47,17	2359	2273 \pm 86	0,169	114,2	28543	33607 \pm 5064
			0,073	43,73	2187		0,220	154,7	38671	
	1	0,071	42,37	2118	1916 \pm 202	0,255	183,6	45894	47688 \pm 1794	
		0,059	34,29	1714		0,272	197,9	49481		
<i>P. officinalis</i> 2	herba	100	0,078	47,17	2359	2359 \pm 0	0,344	200,0	50000	48641 \pm 1359
			0,078	47,17	2359		0,329	189,1	47282	
		10	0,070	41,69	2084	2050 \pm 34	0,317	180,6	45143	48955 \pm 3812
			0,068	40,33	2016		0,359	211,1	52768	
	1	0,063	36,96	1848	1915 \pm 67	0,320	182,7	45675	43057 \pm 2618	
		0,067	39,65	1983		0,290	161,8	40440		
	koren	50	0,155	103,39	5170	5048 \pm 122	0,461	292,1	73030	85462 \pm 2432
			0,138	90,52	4526		0,528	351,6	87893	
		5	0,072	43,05	2152	2221 \pm 69	0,346	201,5	50366	54994 \pm 4628
			0,076	45,79	2290		0,395	238,5	59622	
	0,5	0,070	41,69	2084	2170 \pm 85	0,209	108,7	27181	34586 \pm 7405	
		0,075	45,10	2255		0,299	168,0	41991		
<i>P. judaica</i> 1	herba	100	0,073	43,73	2187	2221 \pm 34	0,331	190,6	47642	47372 \pm 269
			0,075	45,10	2255		0,328	188,4	47103	
		10	0,077	46,48	2324	2136 \pm 188	0,285	158,3	39585	40961 \pm 1376
			0,066	38,98	1949		0,301	169,4	42338	
	1	0,100	62,64	3132	2937 \pm 195	0,376	223,9	55966	45181 \pm 10786	
		0,089	54,84	2742		0,254	137,6	34395		
	koren	50	0,182	124,3	6216	6059 \pm 156	0,454	286,2	71553	73466 \pm 1913
			0,148	98,06	4903		0,472	301,5	75379	
		5	0,062	36,29	1814	1949 \pm 135x	0,399	241,6	60403	48559 \pm 11844
			0,070	41,69	2084		0,268	146,9	36716	
	0,5	0,071	42,37	2118	2290 \pm 172	0,376	223,9	55966	51535 \pm 4432	
		0,081	49,25	2462		0,328	188,4	47103		
<i>P. lusitanica</i> 1	herba	100	0,086	52,73	2637	3110 \pm 374	0,324	185,5	46387	41468 \pm 4919
			0,107	67,68	3384		0,267	146,2	36549	
		10	0,067	39,65	1983	2085 \pm 102	0,324	185,5	46387	42731 \pm 3656
	0,073		43,73	2187	0,282		156,3	39075		
	1	0,073	43,73	2187	2325 \pm 138	0,368	217,8	54453	47790 \pm 6663	
		0,081	49,25	2462		0,294	164,5	41127		

*koncentracija očitana sa kalibracione krive pomnožena sa faktorom razblaženja (-LPSx50; +LPSx250)

Uticaj ekstrakata na sekreciju citokina rat MCP1 i GRO α u prisustvu inhibitora (IEC18 ćelije)Tabela 8.33. Koncentracije i apsorbancije standardnih rastvora proteina rat MCP1 i GRO α za konstruisanje kalibracione krive.

rat MCP1		GRO α	
Crad [pg/ml]	A (540 nm)	Crad [pg/ml]	A (540 nm)
5000	1,226	1000	0,650
2500	0,840	500	0,417
1250	0,529	250	0,234
312,5	0,146	62,50	0,075
78,13	0,038	15,62	0,021
19,53	0,005	3,900	0,007
4,88	0,005	0,970	0,004

Apsorbancije standardnih rastvora proteina rat MCP1 i GRO α su očitane pomoću BIO RAD, 680 XR spektrofotometra, a kalibracione krive su konstruisane u povezanom softveru Microplate manager, ver 5.2.1. BIO RAD. Pomoću ovog spektrofotometra očitane su apsorbancije uzoraka i direktno iz softvera određena odgovarajuća koncentracija ovih proteina sa kalibracionih krivih (dato u naredne dve tabele).

Tabela 8.34. Rezultati određivanja koncentracija proteina rat MCP1 i GRO α sa inhibitorima protein kinaza (IEC18 ćelije).

	rat MCP1				GRO α			C _{GROα} \pm SEM [pg/mL]	
	A (450 nm)	[pg/mL] sa kal.k.	[pg/mL]* u uzorku	C _{MCP1} \pm SEM [pg/mL]	A (450 nm)	[pg/mL] sa kal.k.	[pg/mL]* u uzorku		
kontrola	0,068	162,9	40729	46481 \pm 2794	0,034	24,48	1224	1338 \pm 99	
	0,075	177,4	44344		0,034	24,48	1224		
	0,080	187,6	46898		0,043	32,68	1634		
	0,094	215,8	53955		0,035	25,37	1269		
kontrola + DMSO	0,086	199,8	49938	53418 \pm 3505	0,037	27,17	1359	1674 \pm 180	
	0,088	203,8	50946		0,045	34,56	1728		
	0,084	195,7	48928		0,039	28,99	1449		
	0,114	255,4	63858		0,054	43,19	2160		
<i>U. dioica</i> - herba	sam ekstrakt	0,154	333,4	83357	79120 \pm 4237	0,064	53,12	2656	2122 \pm 534
		0,111	299,5	74883		0,042	31,75	1588	
	eks + Bay11-7082	0,120	267,2	66802	61126 \pm 5675	0,030	20,98	1049	943 \pm 106
		0,097	221,8	55451		0,025	16,74	837	
	eks + Wortmannin	0,193	409,2	102312	105000 \pm 2688	0,105	96,46	4823	4605 \pm 218
		0,204	430,8	107688		0,097	87,73	4387	
	eks + SB203580	0,050	124,6	31158	33579 \pm 2421	0,047	36,45	1822	1501 \pm 321
		0,059	144,0	36001		0,033	23,60	1180	
	eks + PD98059	0,143	312,1	78015	78015 \pm 0	0,073	62,31	3115	3064 \pm 52
		0,143	312,1	78015		0,071	60,25	3012	
	eks + SP600152	0,129	284,8	71200	67302 \pm 3898	0,053	42,22	2111	2087 \pm 24
		0,108	253,6	63404		0,052	41,25	2062	
<i>U. dioica</i> - koren	sam ekstrakt	0,146	317,9	79473	83841 \pm 4369	0,112	104,2	5209	4923 \pm 286
		0,164	352,8	88210		0,083	72,75	3638	
	eks + Bay11-7082	0,092	211,8	52954	52954 \pm 0	0,045	34,56	1728	1775 \pm 47
		0,092	211,8	52954		0,047	36,45	1822	
	eks + Wortmannin	0,166	356,7	89180	96478 \pm 7298	0,134	128,9	6445	4781 \pm 664
		0,196	415,1	103776		0,092	82,34	4117	
	eks + SB203580	0,077	181,5	45368	44856 \pm 512	0,061	50,11	2505	2530 \pm 25
		0,075	177,4	44344		0,062	51,11	2555	
	eks + PD98059	0,121	269,2	67291	68514 \pm 1222x	0,096	86,65	4333	3750 \pm 583
		0,126	278,9	69736		0,074	63,34	3167	
	eks + SP600152	0,116	259,4	64841	67288 \pm 2448	0,080	69,59	3480	3323 \pm 156
		0,126	278,9	69736		0,074	63,34	3167	

	Uzorak	rat MCP1			$C_{MCP1} \pm SEM$ [pg/mL]	GRO α			$C_{GRO\alpha} \pm SEM$ [pg/mL]
		A (450 nm)	[pg/mL] sa kal.k.	[pg/mL]* u uzorku		A (450 nm)	[pg/mL] sa kal.k.	[pg/mL]* u uzorku	
<i>P. officinalis</i> 2 - koren	sam ekstrakt	0,377	789,9	197466	202278 ± 4813	0,205	212,5	10625	10625 ± 0
		0,394	828,4	207091		0,205	212,5	10625	
	eks + Bay11-7082	0,190	403,4	100850	87487 ± 13363	0,095	85,57	4279	3620 ± 659
		0,135	296,5	74124		0,070	59,22	2961	
	eks + Wortmannin	0,500	1087,9	271974	269033 ± 2941	0,225	237,0	11850	12441 ± 592
		0,491	1064,4	266092		0,244	260,7	13033	
	eks + SB203580	0,375	785,4	196345	194672 ± 1673	0,219	229,6	11480	11882 ± 402
		0,369	772,0	192999		0,248	265,7	13284	
	eks + PD98059	0,393	826,1	206520	218520 ± 12001	0,204	211,3	10564	10413 ± 151
		0,434	922,1	230521		0,199	205,2	10262	
eks + SP600152	0,275	572,3	143081	168596 ± 25516	0,200	206,4	10322	8313 ± 1009	
	0,371	776,4	194112		0,149	146,1	7305		
<i>P. judaica</i> 2 - koren	sam ekstrakt	0,398	837,5	209383	227272 ± 17889	0,202	208,9	10443	11146 ± 703
		0,458	980,6	245161		0,225	237,0	11850	
	eks + Bay11-7082	0,145	315,9	78987	70192 ± 8795	0,054	43,19	2160	2741 ± 582
		0,109	245,6	61397		0,077	66,46	3323	
	eks + Wortmannin	0,488	1056,6	264148	304100 ± 9952	0,251	269,5	13474	13568 ± 95
		0,561	1256,2	314052		0,254	273,3	13663	
	eks + SB203580	0,341	710,6	177662	169941 ± 7721	0,196	201,6	10080	10596 ± 516
		0,312	648,9	162220		0,213	222,2	11112	
	eks + PD98059	0,420	888,8	222189	254465 ± 12276	0,264	286,0	14300	14108 ± 191
		0,492	1067,0	266741		0,258	278,3	13917	
eks + SP600152	0,384	805,6	201407	206547 ± 5140	0,226	238,2	11911	11542 ± 369	
	0,402	846,7	211687		0,214	223,5	11173		
<i>P. lusitanica</i> 1 - herba	sam ekstrakt	0,101	229,8	57440	61631 ± 4191	0,046	35,50	1775	1870 ± 95
		0,118	263,3	65822		0,050	39,32	1966	
	eks + Bay11-7082	0,082	191,7	47915	46897 ± 1018	0,025	16,74	837	858 ± 21
		0,078	183,5	45879		0,026	17,57	879	
	eks + Wortmannin	0,158	341,2	85298	104437 ± 9139	0,102	93,17	4659	4469 ± 190
		0,216	454,3	113577		0,095	85,57	4279	
	eks + SB203580	0,057	139,7	34936	37311 ± 2375	0,032	22,72	1136	1092 ± 44
		0,066	158,7	39686		0,030	20,98	1049	
	eks + PD98059	0,123	273,1	68270	70953 ± 2684	0,061	50,11	2505	2708 ± 202
		0,134	294,5	73637		0,069	58,20	2910	
eks + SP600152	0,084	195,7	48928	51191 ± 2263	0,043	32,68	1634	1611 ± 23	
	0,093	213,8	53455		0,042	31,75	1588		

* koncentracija očitana sa kalibracione krive pomnožena sa faktorom razblaženja (GRO α x50; rat MCP1x250).

Uticaj ekstrakata na sekreciju citokina rat MCP1 i GRO α kod ćelija sa shRNA TRL4 i shRNA MyD88

Tabela 8.35. Rezultati određivanja koncentracija proteina rat MCP1 i GRO α kod IEC18 ćelija sa shRNA TRL4 i shRNA MyD88.

	GRO α				rat MCP1				
	A (450 nm)	[pg/mL] sa kal. k.	[pg/mL]* u uzorku	C _{GROα} \pm SEM [pg/mL]	A (450 nm)	[pg/mL] sa kal, k.	[pg/mL]* u uzorku	C _{MCP1} \pm SEM [pg/mL]	
kontrola	kontrola	0,059	35,09	1755	1888 \pm 134	0,087	163,7	40930	44337 \pm 3408
		0,067	40,45	2022		0,099	191,0	47745	
	LPS	0,412	375,6	18782	19009 \pm 227	0,709	2218	554375	561010 \pm 6635
		0,419	384,7	19236		0,722	2271	567646	
	<i>U. dioica6</i> - H	0,074	45,24	2262	2455 \pm 193	0,129	262,6	65647	69069 \pm 3422
		0,085	52,95	2647		0,140	290,0	72492	
	<i>U. dioica6</i> - K	0,100	63,80	3190	3452 \pm 262	0,129	262,6	65647	72241 \pm 6594
		0,114	74,29	3714		0,150	315,3	78834	
	<i>P. officinalis2</i> - K	0,141	95,42	4771	5036 \pm 265	0,184	404,8	101197	108042 \pm 6844
		0,154	106,0	5301		0,204	459,5	114886	
	<i>P. judaica1</i> - K	0,165	115,2	5760	5952 \pm 191	0,183	402,1	100523	103575 \pm 3052
		0,174	122,9	6143		0,192	426,5	106628	
<i>P. lusitanica1</i> - H	0,115	75,05	3753	3147 \pm 606	0,166	356,8	89210	78354 \pm 10855	
	0,082	50,82	2541		0,132	270,0	67499		
shRNA MyD88	kontrola	0,018	9,949	497,5	497,5 \pm 0,0	0,017	26,64	6659	6271 \pm 388
		0,018	9,949	497,5		0,015	23,53	5883	
	LPS	0,059	35,09	1755	2183 \pm 428,6	0,062	109,9	27473	31446 \pm 3974
		0,084	52,24	2612		0,077	141,7	35420	
	<i>U. dioica6</i> - H	0,022	12,19	609,7	624,0 \pm 14,25	0,022	34,69	8672	10378 \pm 1706
		0,023	12,76	638,2		0,030	48,34	12085	
	<i>U. dioica6</i> - K	0,022	12,19	609,7	581,5 \pm 28,25	0,013	20,51	5127	5698 \pm 571
		0,020	11,06	553,2		0,016	25,08	6269	
	<i>P. officinalis2</i> - K	0,024	13,34	666,9	754,5 \pm 87,65	0,017	26,64	6659	9372 \pm 2713
		0,030	16,84	842,2		0,030	48,34	12085	
	<i>P. judaica1</i> - K	0,026	14,49	724,7	724,7 \pm 0,0	0,022	34,69	8672	8672 \pm 0
		0,026	14,49	724,7		0,022	34,69	8672	
<i>P. lusitanica1</i> - H	0,020	11,06	553,2	581,5 \pm 28,3	0,019	29,81	7452	8478 \pm 1027	
	0,022	12,19	609,7		0,024	38,02	9505		
shRNA TLR4	kontrola	0,096	60,87	3044	3154 \pm 110,3	0,162	346,4	86591	94232 \pm 7641
		0,102	65,28	3264		0,185	407,5	101873	
	LPS	0,327	273,6	13678	12596 \pm 1082	0,437	1191	297747	274026 \pm 23722
		0,287	230,3	11514		0,381	1001	250304	
	<i>U. dioica6</i> - H	0,135	90,62	4531	4452 \pm 79	0,199	445,7	111429	114548 \pm 3120
		0,131	87,46	4373		0,208	470,7	117668	
	<i>U. dioica6</i> - K	0,133	89,04	4452	4064 \pm 388	0,201	451,2	112809	104319 \pm 8490
		0,113	73,53	3676		0,176	383,3	95830	
	<i>P. officinalis2</i> - K	0,159	110,2	5509	5571 \pm 63	0,234	544,4	136101	148209 \pm 12109
		0,162	112,7	5634		0,267	641,3	160318	
	<i>P. judaica1</i> - K	0,173	122,0	6100	6057 \pm 43	0,277	671,3	167829	156316 \pm 11513
		0,171	120,3	6015		0,246	579,2	144804	
<i>P. lusitanica1</i> - H	0,105	67,51	3376	3641 \pm 265	0,191	423,8	105945	117088 \pm 11143	
	0,119	78,11	3906		0,223	512,9	128230		

* koncentracija očitana sa kalibracione krive pomnožena sa faktorom razblaženja (GRO α x50; rat MCP1x250),

Tabela 8.36. Koncentracije i apsorbancije standardnih rastvora proteina rat MCP1 i GRO α za konstruisanje kalibracione krive.

rat MCP1		GRO α	
Crad [pg/ml]	A (540 nm)	Crad [pg/ml]	A (540 nm)
5000	1,309	1000	0,766
2500	0,765	500	0,495
1250	0,472	250	0,312
312,5	0,140	62,50	0,100
78,13	0,039	15,62	0,009
19,53	0,012	3,900	0,006
4,88	0,010	0,970	

Apsorbancije standardnih rastvora proteina rat MCP1 i GRO α su očitane pomoću BIO RAD, 680 XR spektrofotometra, a kalibracione krive su konstruisane u povezanom softveru Microplate manager, ver 5.2.1. BIO RAD. Pomoću ovog spektrofotometra očitane su apsorbancije uzoraka i direktno iz softvera određena odgovarajuća koncentracija ovih proteina sa kalibracionih krivih (dato u prethodnoj tabeli).

8.9.3. Uticaj ekstrakata na ekspresiju enzima COX-2 u IEC18 ćelijama

Tabela 8.37. Rezultati kvantifikacije COX-2 metodom Western blot-a u LPS-stimulisanim IEC18 ćelijama (slike gelova date su u Dodatnom materijalu na CD-u).

	COX-2		Aktin		COX-2/aktin	% LPS-a	% LPS-a \pm SEM	
	Area*	Area/kon	Area*	Area/kon				
gel 1	kontrola	41433		27619				
	kontrola + LPS	67099	1,619	24575	0,890	1,820	2,364**	
		65611	1,584	15039	0,545	2,908		
	<i>U. dioica6</i> - herba	66881	1,614	17517	0,634	2,545	107,7	95,3 \pm 12,4
	Crad [100 μ g/mL]	78459	1,894	26650	0,965	1,962	83,0	
	<i>U. dioica6</i> - koren	71146	1,717	34607	1,253	1,370	58,0	56,7 \pm 1,3
Crad [100 μ g/mL]	71917	1,736	36580	1,324	1,311	55,4		
gel 2	kontrola	29656 21691	21961**	39465 34061	36763**			
	kontrola + LPS	69606	1,367	30707	1,028	1,330	1,285**	
		79455	1,560	37547	1,257	1,241		
	<i>P. officinalis2</i> - herba	73451	1,442	35621	1,193	1,210	94,1	88,7 \pm 5,4
	Crad [100 μ g/mL]	72682	1,427	39822	1,333	1,071	83,3	
	<i>P. officinalis2</i> - koren	75947	1,491	26200	0,877	1,700	132,3	144,8 \pm 12,6
Crad [50 μ g/mL]	80612	1,583	23381	0,783	2,022	157,4		
gel 3	kontrola	49248 52599	50923**	27367 32372	29870**			
	kontrola + LPS	76227	1,138	24890	0,796	1,429	1,257**	
		71619	1,069	30791	0,985	1,085		
	<i>P. judaica1</i> - herba	83495	1,246	34626	1,108	1,125	89,5	86,0 \pm 3,6
	Crad [100 μ g/mL]	80388	1,200	36200	1,158	1,036	82,4	
	<i>P. judaica1</i> - koren	78513	1,172	42288	1,353	0,866	68,9	80,7 \pm 11,8
Crad [50 μ g/mL]	85053	1,270	34153	1,093	1,162	92,5		
gel 4	kontrola	70094 63875	66985**	35483 27037	31260**			
	kontrola + LPS	28217	1,301	20964	0,570	2,281	2,130**	
		27415	1,264	23475	0,639	1,979		
	<i>P. lusitanica1</i> - herba	29671	1,368	23134	0,629	2,174	102,1	99,3 \pm 2,8
	Crad [100 μ g/mL]	24586	1,133	20278	0,552	2,055	96,5	

*površina određena pomoću programa Image J;

**srednje vrednosti kontrola.

8.9.4. Uticaj ekstrakata na ekspresiju proteina PCNA u IEC18 ćelijama

Tabela 8.38. Rezultati kvantifikacije PCNA metodom Western blot-a (slike gelova date su u Dodatnom materijalu na CD-u).

	Crad [µg/mL]	PCNA		Aktin		PSNA/actin	% u odnosu na kontrolu	
		Area*	Area/control	Area*	Area/control			
gel 1	kontrola		21824	1,000	10596	1,000		
	<i>U. dioica</i> 6 herba	100	22613	1,036	25525	2,409	0,430	43,01
		10	24483	1,122	18012	1,700	0,660	66,00
		1	19622	0,899	15528	1,465	0,614	61,35
	<i>U. dioica</i> 6 koren	100	22451	1,029	20743	1,957	0,526	52,55
		10	27701	1,269	24117	2,276	0,558	55,77
1		33984	1,557	29842	2,816	0,553	55,29	
gel 2	kontrola		24560	1,000	20061	1,000		
	<i>P. officinalis</i> 2 herba	100	29319	1,194	23536	1,173	1,018	101,75
		10	32658	1,330	8838	0,441	3,018	301,85
		1	25500	1,038	5954	0,297	3,498	349,81
	<i>P. officinalis</i> 2 koren	50	6739	0,274	4680	0,233	1,176	117,60
		5	28425	1,157	3223	0,161	7,203	720,33
0,5		28532	1,162	2678	0,133	8,703	870,34	
gel 3	kontrola		30053	1,000	18815	1,000		
	<i>P. judaica</i> 1 herba	100	30874	1,027	19500	1,036	0,991	99,12
		10	32569	1,084	21998	1,169	0,927	92,69
		1	29463	0,980	20839	1,108	0,885	88,52
	<i>P. judaica</i> 1 koren	50	27951	0,930	21897	1,164	0,799	79,91
		5	20535	0,683	26277	1,397	0,489	48,92
0,5		19395	0,645	22271	1,184	0,545	54,52	
gel 4	kontrola		19394	1,000	25307	1,000		
	<i>P. lusitanica</i> 1 herba	100	20916	1,078	14472	0,572	1,886	188,60
		10	24075	1,241	17986	0,711	1,747	174,66
1		32413	1,671	24384	0,964	1,735	173,46	

*površina određena pomoću programa Image J.

8.9.5. Kvantifikacija citokina IL-8 i humanog MCP1 iz Caco2 ćelija

Tabela 8.39. Koncentracije i apsorbancije standardnih rastvora proteina IL-8 i humani MCP1 za konstruisanje kalibracione krive.

IL-8		humani MCP1	
Crad [pg/ml]	A (450 nm)	Crad [pg/ml]	A (450 nm)
5000	2,778	5000	2,419
2500	2,534	2500	2,085
1250	2,333	1250	1,639
312,5	1,572	312,5	0,670
78,13	0,655	78,13	0,196
19,53	0,193	19,53	0,053
4,88	0,058	4,88	0,021

Apsorbancije standardnih rastvora proteina IL-8 i humani MCP1 su očitane pomoću BIO RAD, 680 XR spektrofotometra, a kalibracione krive su konstruisane u povezanom softveru Microplate manager, ver 5.2.1. BIO RAD. Pomoću ovog spektrofotometra očitane su apsorbancije uzoraka i direktno iz softvera određena odgovarajuća koncentracija ovih proteina sa kalibracionih krivih (dato u narednoj tabeli).

Tabela 8.40. Rezultati određivanja koncentracije proteina IL-8 i humanog MCP1u uslovima LPS-stimulisanе inflamacije Caco2 ćelija.

Uzorak	Crad [µg/mL]	IL-8				humani MCP1			
		A (450 nm)	[pg/mL] sa kal.k.	[pg/mL]* u uzorku	C _{IL-8} ± SEM [pg/mL]	A (450 nm)	[pg/mL]* u uzorku	C _{hMCP1} ± SEM [pg/mL]	
kontrola+LPS		0,274 0,371	27,54 39,01	1377 1950	1664 ± 287	0,168 0,201	74,45 88,76	81,61 ± 7,18	
<i>U. dioica</i> 6	HERBA	100	0,227	22,83	1142	983 ± 159	0,278	117,9	129,7 ± 11,8
			0,169	16,47	824		0,332	141,4	
		10	0,262	26,79	1339	1325 ± 14	0,223	94,33	94,11 ± 0,21
			0,257	26,22	1311		0,222	93,90	
		1	0,341	36,07	1803	1537 ± 266	0,177	74,73	81,55 ± 6,83
			0,250	25,42	1271		0,209	88,36	
	KOREN	100	0,361	38,50	1925	1907 ± 18	0,212	89,64	90,28 ± 0,64
			0,355	37,766	1888		0,215	90,92	
		10	0,309	32,25	1612	1660 ± 47	0,205	86,66	82,82 ± 3,84
			0,325	34,15	1707		0,187	78,99	
		1	0,290	30,02	1501	1463 ± 38	0,231	97,74	96,67 ± 1,07
			0,277	28,51	1426		0,226	95,61	
<i>P. officinalis</i> 2	HERBA	100	0,234	23,03	1152	1213 ± 62	0,251	106,3	104,8 ± 1,5
			0,256	25,50	1275		0,244	103,3	
		10	0,283	28,57	1428	1321 ± 108	0,222	93,90	96,25 ± 2,35
			0,245	24,26	1213		0,233	98,60	
		1	0,282	28,45	1423	1337 ± 85	0,213	90,06	93,90 ± 3,85
			0,252	25,05	1252		0,231	97,74	
	KOREN	50	0,358	37,42	1871	1705 ± 166	0,231	97,74	100,3 ± 2,6
			0,302	30,77	1538		0,243	102,9	
		5	0,266	26,63	1331	1357 ± 26	0,253	107,2	103,9 ± 3,2
			0,275	27,65	1383		0,238	100,7	
		0,5	0,233	22,92	1146	1121 ± 25	0,279	118,3	115,1 ± 3,2
			0,224	21,93	1096		0,264	111,9	
<i>P. judaica</i> 1	HERBA	100	0,220	21,49	1074	1127 ± 53	0,282	119,6	143,0 ± 23,4
			0,239	23,59	1180		0,388	166,3	
		10	0,253	25,16	1258	1410 ± 152	0,241	106,2	99,67 ± 6,57
			0,306	31,23	1562		0,211	93,11	
		1	0,259	25,83	1292	1264 ± 28	0,151	67,09	77,27 ± 10,22
			0,249	24,71	1235		0,198	87,46	
	KOREN	50	0,277	27,88	1394	1449 ± 55	0,197	87,02	69,90 ± 17,18
			0,296	30,07	1503		0,118	52,77	
		5	0,279	28,11	1405	1383 ± 23	0,120	53,64	66,21 ± 12,61
			0,271	27,20	1360		0,178	78,78	
		0,5	0,253	25,16	1258	1531 ± 273	0,252	111,1	114,6 ± 3,5
			0,347	36,09	1805		0,268	118,1	
<i>P. lusitanica</i> 1	HERBA	100	0,289	29,26	1463	1375 ± 88	0,258	113,7	109,1 ± 4,6
			0,258	25,72	1286		0,237	104,5	
		10	0,273	27,42	1371	1449 ± 78	0,208	91,81	80,31 ± 11,53
			0,300	30,53	1527		0,155	68,82	
		1	0,241	23,81	1191	1272 ± 82	0,171	75,75	76,40 ± 0,65
			0,270	27,08	1354		0,174	77,05	

* koncentracija očitana sa kalibracione krive pomnožena sa faktorom razblaženja (IL-8x50), U slučaju hMCP1 uzorak nije bio razblažen te je koncentracija očitana direktno sa kalibracione krive.

8.9.6. Uticaj ekstrakata herbe i korena vrste *P. officinalis* na ekspresiju proteina PCNA i vilina u Caco2 ćelijama

Tabela 8.41. Rezultati kvantifikacije PCNA i vilina metodom Western blot-a (slike gelova date su u Dodatnom materijalu na CD-u).

	Crad [µg/mL]	PCNA		Vilin		Aktin		PSNA/actin	Vilin/actin	PCNA	Vilin	
		Area*	Area/contol	Area*	Area/contol	Area*	Area/contol			% u odnosu na kontrolu ± SEM	% u odnosu na kontrolu ± SEM	
70-80% monosloja	KONTROLA	33706	35605**	24473	24935**	39169	40112**					
		37504		25398		41056						
	HERBA	10	33870	0,951	23695	0,950	39792	0,992	0,959	0,958	89,40 ± 6,49	98,0 ± 2,2
			34636	0,973	29293	1,175	47061	1,173	0,829	1,001		
		100	34478	0,968	32368	1,298	44971	1,121	0,864	1,158	83,80 ± 2,55	137,4 ± 2,2
			29683	0,834	40664	1,631	41141	1,026	0,813	1,590		
	KOREN	5	30375	0,853	37985	1,523	38134	0,951	0,897	1,602	94,10 ± 4,37	153,9 ± 6,4
			37354	1,049	39178	1,571	42730	1,065	0,985	1,475		
		50	35649	1,001	38781	1,555	41831	1,043	0,960	1,491	88,80 ± 7,18	160,3 ± 11,1
			29722	0,835	43704	1,753	41010	1,022	0,816	1,714		
100%-ni monosloj (konfluentne ćelije)	KONTROLA	50355	49479**	23250	23199**	42602	40639**					
		48603		23147		38676						
	HERBA	10	45452	0,919	23219	1,001	34986	0,861	1,067	1,163	106,2 ± 0,5	124,2 ± 8,0
			41448	0,838	24316	1,048	32230	0,793	1,056	1,322		
		100	42492	0,859	23028	0,993	33905	0,834	1,029	1,190	96,20 ± 6,76	122,1 ± 3,1
			37534	0,759	24646	1,062	34475	0,848	0,894	1,252		
	KOREN	5	34741	0,702	29327	1,264	37362	0,919	0,764	1,375	69,00 ± 7,39	149,1 ± 11,7
			29676	0,600	36309	1,565	39569	0,974	0,616	1,607		
		50	34221	0,692	34894	1,504	39548	0,973	0,711	1,546	71,70 ± 0,67	162,9 ± 8,4
			37526	0,758	41635	1,795	42571	1,048	0,724	1,713		
3 dana nakon postignutog monosloja (konfluencije)	KONTROLA	49071	47376**	29067	28756**	50922	49491**					
		45682		28446		48060						
	HERBA	10	41010	0,8656	28666	0,997	43024	0,869	0,996	1,147	102,3 ± 2,70	105,7 ± 9,0
			46001	0,9710	25721	0,894	45775	0,925	1,050	0,967		
		100	42931	0,9062	30390	1,057	42259	0,854	1,061	1,238	103,4 ± 2,71	119,6 ± 4,2
			39368	0,8310	27367	0,952	40837	0,825	1,007	1,153		
	KOREN	5	40247	0,8495	27667	0,962	43385	0,877	0,969	1,098	95,90 ± 1,03	115,8 ± 6,0
			37321	0,7878	29097	1,012	41108	0,831	0,948	1,218		
		50	37681	0,7954	29567	1,028	42205	0,853	0,933	1,206	92,90 ± 0,33	121,9 ± 1,3
			37979	0,8016	30672	1,067	42842	0,866	0,926	1,232		

*površina određena pomoću programa Image J; **srednje vrednosti kontrola.

KRATKA BIOGRAFIJA

Marina Francišković je rođena u Vrbasu, 24.09.1985. godine. Osnovnu školu završila u Kuli, a gimnaziju „Petro Kuzmjak“ u Ruskom Krsturu kao đak generacije. Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu, odsek diplomirani hemičar – biohemija, upisala je 2004. godine, a diplomirala 2008. godine sa prosekom 9,83, odbranivši diplomski rad pod nazivom „Korelacija antioksidantne aktivnosti i hemijskog sastava različitih ekstrakata kantariona (*Hypericum perforatum* L.)“. Dobitnik je dve nagrade Univerziteta u Novom Sadu za postignut izuzetan uspeh u toku studija, nagrade EFG banke i priznanja Srpskog hemijskog društva. Doktorske studije upisuje 2008. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu, a u zvanje istraživača-pripravnika za užu naučnu oblast Biohemija izabrana je 2010. godine. Dve godine kasnije, izabrana je u zvanje istraživača-saradnika za užu naučnu oblast Biohemija. U zvanje asistenta za užu naučnu oblast Biohemija izabrana je 2015. godine.



Od 2009. godine, kontinuirano je bila angažovana na Katedri za biohemiju i hemiju prirodnih proizvoda, Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine PMF-a u Novom Sadu u izvođenju praktične nastave za studente hemije.

Naučno-istraživački rad Marine Francišković je usmeren na oblast biohemije lekovitog bilja. Do sada je učestvovala u radu na jednom međunarodnom projektu IPA prekogranične saradnje sa Mađarskom i dva naučno-istraživačka projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Koautor je četiri rada objavljenih u međunarodnim časopisima (tri M21, i jedan M23 kategorije). Dodatno, koautor je velikog broja saopštenja na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu. Aktivno govori engleski, španski i ruski jezik.

Usavršavanja u inostranstvu započela je u okviru programa razmene studenata i provela šest nedelja na Tehnološkom univerzitetu u Gracu 2007. godine. U okviru programa razmene naučnog osoblja, 2012. godine je provela šest nedelja na Univerzitetu „Prince of Songkla“ na Tajlandu. Kao dobitnik stipendije Coimbra grupe univerziteta za kratkoročne boravke, provela je četiri meseca (2013 – 2014. godina) na Univerzitetu u Granadi u toku kojih je uradila deo eksperimenata u okviru svoje doktorske disertacije.

Član je Society of Medicinal Plant Research (GA), Srpskog hemijskog društva i Biohemijskog društva Vojvodine.

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada: VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Marina Francišković
Mentor: MN	dr Neda Mimica-Dukić, redovni profesor PMF-a u Novom Sadu
Naslov rada: NR	Fitohemijaska karakterizacija i biološka aktivnost odabranih vrsta tribusa Urticeae i Parietarieae (Urticaceae Juss.)
Jezik publikacije: JP	Srpski
Jezik izvoda: JI	Srpski/engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2015.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3.
Fizički opis rada: FO	Broj poglavlja: 9 (Dodatni materijal na CD-u). Stranica: 480 (160 u Dodatnom materijalu na CD-u). Slika: 257 (161 u Dodatnom materijalu na CD-u). Tabela: 80. Referenci: 452. Priloga: 2 (jedan u štampanoj verziji, drugi priložen na CD-u kao Dodatan materijal).
Naučna oblast: NO	Hemija
Naučna disciplina: ND	Biohemija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Urticaceae, <i>Urtica dioica</i> , <i>Urtica kioviensis</i> , <i>Parietaria judaica</i> , <i>Parietaria officinalis</i> , <i>Parietaria lusitanica</i> , <i>Parietaria serbica</i> , biljni fenoli, antioksidantno dejstvo, antiinflamatorno dejstvo, inhibitori acetilholinesteraze, sekrecija citokina MCP1 i GRO α , epitelizacija, teški metali
Čuva se: ČU	Biblioteka Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, PMF Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3., Novi Sad
Važna napomena: VN	-

<p>Izvod: IZ</p>	<p>U okviru ove doktorske disertacije ispitan je hemijski sastav i biološke aktivnosti metanolnih i vodenih ekstrakata odabranih samoniklih vrsta tribusa Urticeae, rod <i>Urtica</i>: <i>U. dioica</i> subsp. <i>dioica</i> var. <i>pubescens</i>, <i>U. dioica</i> subsp. <i>dioica</i> var. <i>dioica</i> i <i>U. kioviensis</i> i tribusa Parietarieae, rod <i>Parietaria</i>: <i>P. officinalis</i>, <i>P. lusitanica</i> L. subsp. <i>lusitanica</i>, <i>P. judaica</i> L. subsp. <i>judaica</i> i <i>P. serbica</i>. Cilj rada bio je da se odredi sadržaj biološki aktivnih jedinjenja u ovim, do sada veoma malo ispitanim vrstama familije Urticaceae, i utvrdi njihov potencijal primene kao pomoćnih lekovitih sredstava i dodataka ishrani.</p> <p>Hemijski sastav ekstrakata ispitivanih vrsta određen je primenom: tečnrohromatografskih tehnika (LC-DAD-MS i LC-MS-MS) za kvalitativnu analizu metanolnih ekstrakata, dok je za kvantitativnu analizu odabranih fenolnih jedinjenja primenjena LC-MS-MS tehnika. Spektrofotometrijskim metodama je određen sadržaj ukupnih fenolnih komponenti i flavonoida. Ispitivanja bioloških aktivnosti ekstrakata obuhvatila su: određivanje antioksidantne i antiinflamatorne aktivnosti kao i sposobnost ekstrakata da inhibiraju acetilholinesterazu. Određen je uticaj odabranih metanolnih ekstrakata na imuni odgovor i proliferaciju intestinalnih ćelijskih linija pacova (IEC18) i čoveka (Caco2).</p> <p>Dobijeni rezultati ukazuju da odabrane vrste tribusa Urticeae i Parietarieae, odnosno rodova <i>Urtica</i> i <i>Parietaria</i> predstavljaju bogate izvore biološki aktivnih jedinjenja koja ispoljavaju raznovrsne biološke aktivnosti. Sa hemotaksonomskog aspekta izdvajaju se sledeća jedinjenja kao potencijalni taksonomski markeri: viši sadržaj 5-O-kafeoilhinske kiseline u ekstraktima herbi vrsta roda <i>Urtica</i>, i visok sadržaj epikatehina u ekstraktima korena vrsta roda <i>Parietaria</i>. Ekstrakt herbe vrste <i>U. kioviensis</i> se od ostalih izdvaja po tome što ne sadrži rutin a sadrži C-glikozide, u najvećoj meri viteksin. Od svih ispitivanih ekstrakata, ekstrakti korena <i>Parietaria</i> vrsta su ispoljili najbolji antioksidantni potencijal u većini izvršenih testova. Naj snažniji antiinflamatorni potencijal je ispoljio ekstrakt korena vrste <i>P. officinalis</i> a prate ga ekstrakti korena vrsta roda <i>Urtica</i>. Veoma dobar antiinflamatorni potencijal su ispoljili infuzi herbi vrste <i>U. dioica</i> (čajevi od koprive). Svi ispitani metanolni ekstrakti su ispoljili odličnu inhibiciju enzima acetilholinesteraze a kao najbolji se izdvajaju ekstrakti korena <i>Parietaria</i> vrsta i vrste <i>U. kioviensis</i>. Povećanu sekreciju citokina rat MCP1 i GROα izazivaju ekstrakti korena vrsta <i>P. officinalis</i> i <i>P. judaica</i> u bazalnim uslovima i uslovima LPS-stimulisane inflamacije, dok ekstrakti vrste <i>U. dioica</i> povećavaju bazalnu a smanjuju LPS-stimulisanu sekreciju. Stimulaciju sekrecije ova dva citokina, ispitivani ekstrakti vrše interakcijom sa adaptivnim proteinom MyD88 (ali ne intereaguju sa TLR4 receptorom) i NF-κB signalnim putem. Ekstrakt korena vrste <i>P. officinalis</i> povećava LPS-om indukovanu ekspresiju enzima COX-2 u IEC18 ćelijama, dok je ekstrakt korena vrste <i>U. dioica</i> smanjuje. Efekat epitelizacije ili zarastanja rane na monosloju IEC18 ćelija ispoljavaju ekstrakti herbe i korena vrste <i>P. officinalis</i>. Ispitivani ekstrakti ne menjaju značajno sekreciju citokina hMCP1 i IL-8 u Caco2 ćelijama niti ispoljavaju značajan uticaj na njihovu proliferaciju.</p>
<p>Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP</p>	<p>27.12.2013.</p>
<p>Datum odbrane: DO</p>	<p>2015.</p>
<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	
<p>Predsednik:</p>	<p>dr Goran Anačkov, vanredni profesor PMF-a u Novom Sadu</p>
<p>Mentor:</p>	<p>dr Neda Mimica-Dukić, redovni profesor PMF-a u Novom Sadu</p>
<p>Član:</p>	<p>dr Biljana Božin, vanredni profesor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu</p>
<p>Član:</p>	<p>dr Dejan Orčić, docent PMF-a u Novom Sadu</p>

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES
KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Marina Francišković
Mentor: MN	Dr Neda Mimica-Dukić, Full Professor, University of Novi Sad Faculty of Sciences
Title: TI	Phytochemical characterization and biological activity of selected species belonging to the Urticeae and Parietarieae tribe (Urticaceae Juss.)
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian/English
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2015.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3
Physical description: PD	Chapters: 9 (Supplementary data on CD). Pages: 480 (160 on Supplementary data on CD). Figures: 257 (161 on Supplementary data on CD). Tables: 80. References: 452. Additional lists: 2 (first printed, second given as Supplementary data on CD).
Scientific field SF	Chemistry
Scientific discipline SD	Biochemistry
Subject, Key words SKW	Urticaceae, <i>Urtica dioica</i> , <i>Urtica kioviensis</i> , <i>Parietaria judaica</i> , <i>Parietaria officinalis</i> , <i>Parietaria lusitanica</i> , <i>Parietaria serbica</i> , plant phenolics, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, acetylcholine esterase inhibitors, secretion of cytokines MCP1 i GRO α , wound healing, heavy metals
Holding data: HD	Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection (Library), University of Novi Sad, Faculty of Sciences, Trg Dositeja Obradovića 3, Novi Sad
Note: N	-

<p>Abstract: AB</p>	<p>Within this doctoral thesis the chemical composition and biological activity of methanol and aqueous extracts of the selected plant species belonging to the Urticeae and Parietarieae tribe, more specifically to the <i>Urtica</i> and <i>Parietaria</i> genres was evaluated (<i>Urtica</i>: <i>U. dioica</i> subsp. <i>dioica</i> var. <i>pubescens</i>, <i>U. dioica</i> subsp. <i>dioica</i> var. <i>dioica</i> and <i>U. kioviensis</i>; <i>Parietaria</i>: <i>P. officinalis</i>, <i>P. lusitanica</i> subsp. <i>lusitanica</i>, <i>P. judaica</i> subsp. <i>judaica</i> and <i>P. serbica</i>). The principal aim was to determine the content of biologically active compounds in this, poorly examined species of the Urticaceae family, and determine their potential as additional remedy and dietary supplements.</p> <p>Qualitative analysis of methanol extracts was performed by LC-DAD-MS i LC-MS/MS analysis, and LC-MS/MS for quantitative analysis of selected phenolic compounds. Total phenolics and flavonoids were determined spectrophotometrically. In order to assess the biological potential, the antioxidant and anti-inflammatory activities of the extracts were studied as well as their ability to inhibit acetylcholinesterase. The immuno-modulatory effects of the selected methanol extract on the immune response and proliferation of intestinal epithelial cells (IEC18 and Caco2) was determined.</p> <p>The obtained results suggest that the examined species of the Urticeae and Parietarieae tribe (genres <i>Urtica</i> and <i>Parietaria</i>) are abundant with the biologically active compounds that express a broad spectrum of biological activities. As a potential chemotaxonomic markers stand out the following compounds: 5-<i>O</i>-caffeoilquinic acid (highly abundant in the herb extracts of the <i>Urtica</i> spp.) and epicatechin (highly abundant in the root extracts of the <i>Parietaria</i> spp.). <i>U. kioviensis</i> herb extracts differs from the rest by high content of vitexin and total lack of rutin. The best antioxidant potential have exhibited the root extracts of the <i>Parietaria</i> species. The strongest anti-inflammatory potential had the root extract of the <i>P. officinalis</i>, followed by root extracts of the <i>Urtica</i> spp. Excellent anti-inflammatory activity have exhibited the aqueous extracts of <i>U. dioica</i> herbs – stinging nettle teas. All tested methanol extracts have inhibited enzyme acetylcholinesterase, the best inhibitors being root extracts of <i>U. kioviensis</i> and <i>Parietaria</i> species. Root extracts of <i>P. officinalis</i> and <i>P. judaica</i> have increased the basal and LPS-stimulated secretion of rat MCP1 and GROα, while <i>U. dioica</i> extracts increased the basal but decreased the LPS-stimulated secretion. The examined extracts interact with the MyD88 (but not the TLR4) and NF-κB signaling pathway. The root extract of <i>P. officinalis</i> increase LPS-stimulated expression of COX-2 in IEC18 cells, while the root extract of <i>U. dioica</i> decreases it. The herb and root extract of <i>P. officinalis</i> exhibit the wound healing effect. Investigated extracts do not significantly alter the secretion of hMCP1 and IL-8 in Caco2 cells and exhibit no significant effect to their proliferation.</p>
<p>Accepted on Senate on: AS</p>	<p>27.12.2013.</p>
<p>Defended: DE</p>	<p>2015.</p>
<p>Thesis Defend Board: DB</p>	
<p>Chairperson:</p>	<p>Dr Goran Anačkov, Associate Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad</p>
<p>Mentor:</p>	<p>Dr Neda Mimica-Dukić, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad</p>
<p>Member:</p>	<p>Dr Biljana Božin, Associate Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad</p>
<p>Member:</p>	<p>Dr Dejan Orčić, Assistant Professor, , Faculty of Sciences, University of Novi Sad</p>



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU, BIOHEMIJU
I ZAŠTITU ŽIVOTNE SREDINE

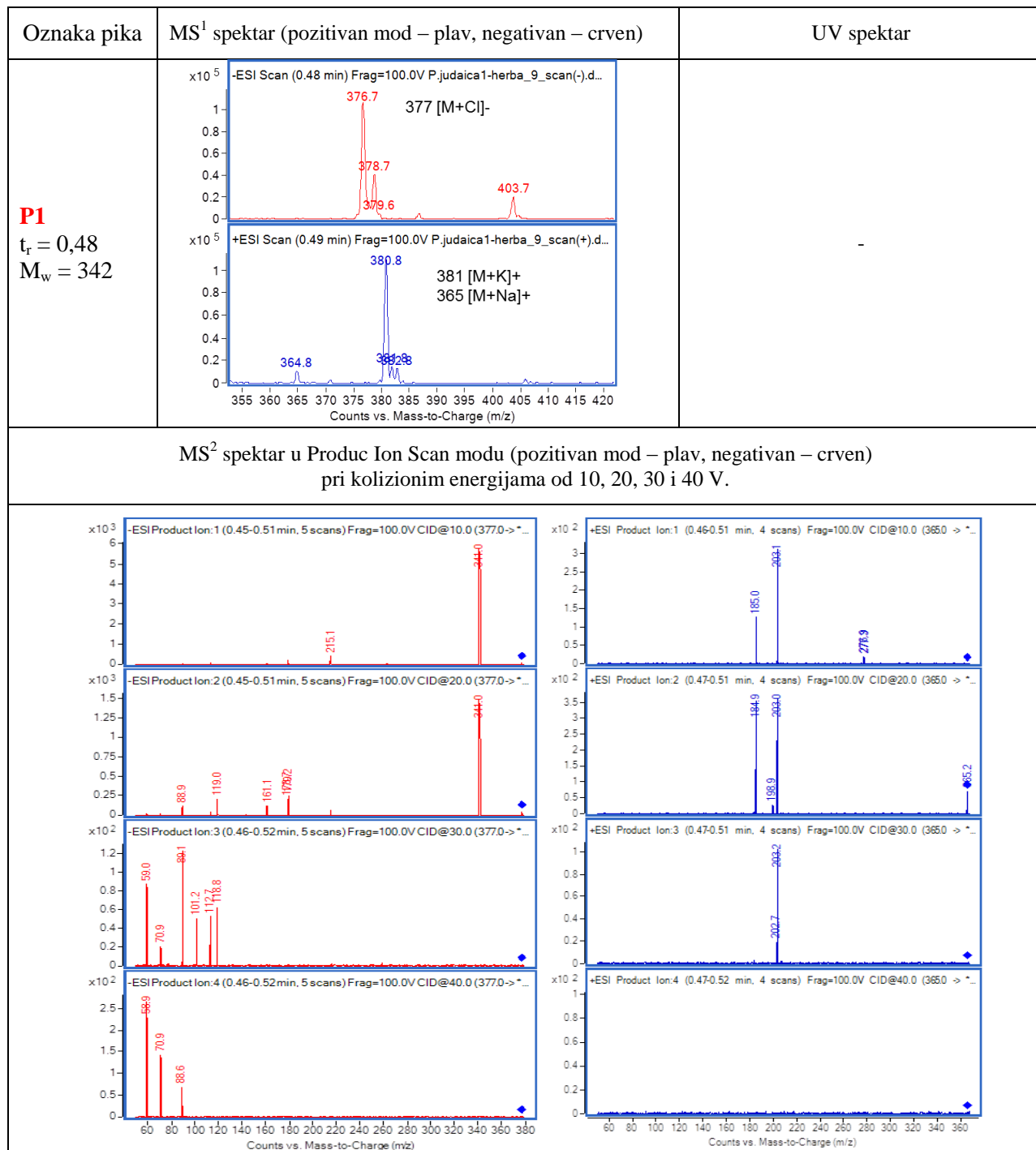


MARINA FRANCIŠKOVIĆ

- DODATNI MATERIJAL UZ DOKTORSKU DISERTACIJU -

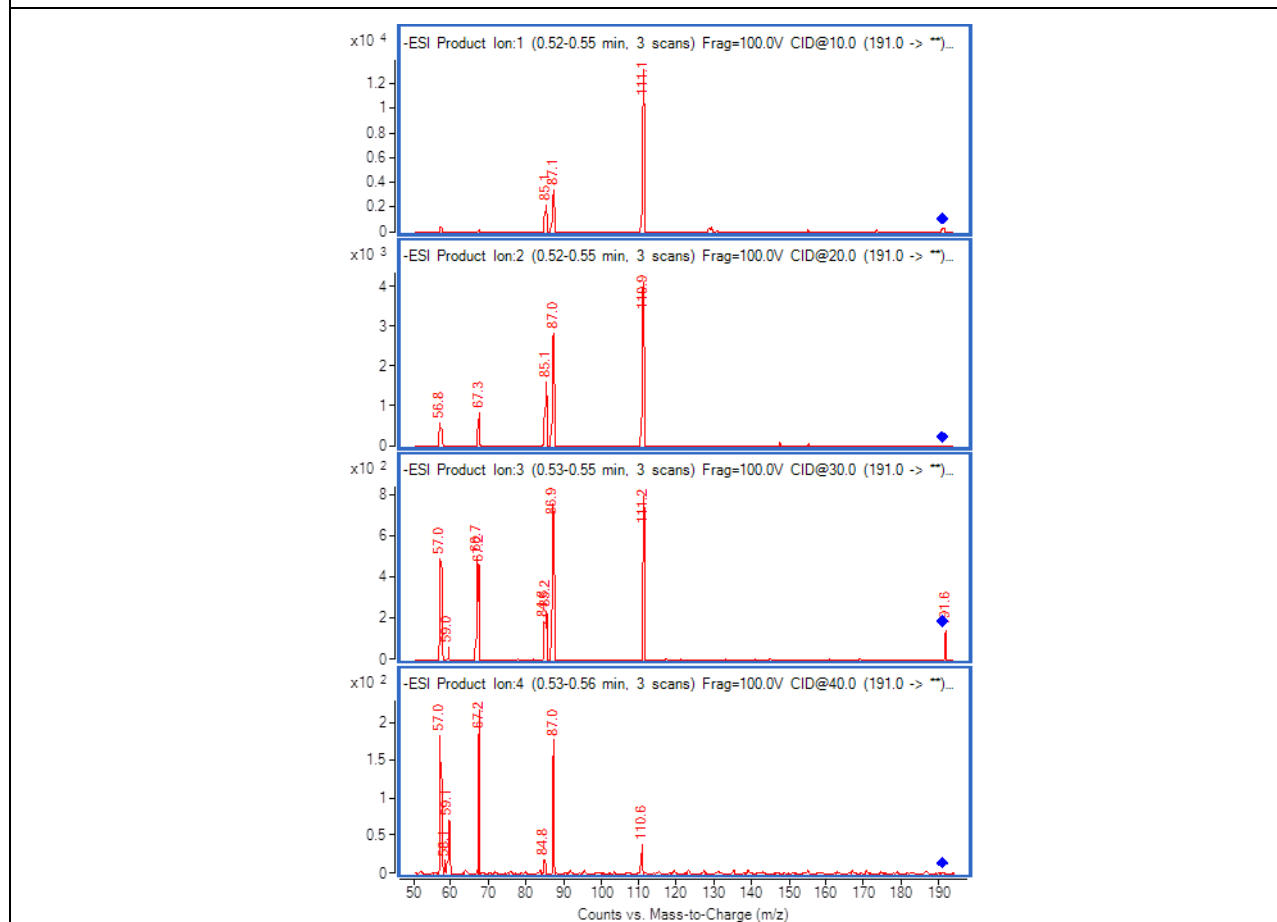
FITOHEMIJSKA KARAKTERIZACIJA I BIOLOŠKA AKTIVNOST
ODABRANIH VRSTA TRIBUSA
URTICEAE I PARIETARIEAE (URTICACEAE JUSS.)

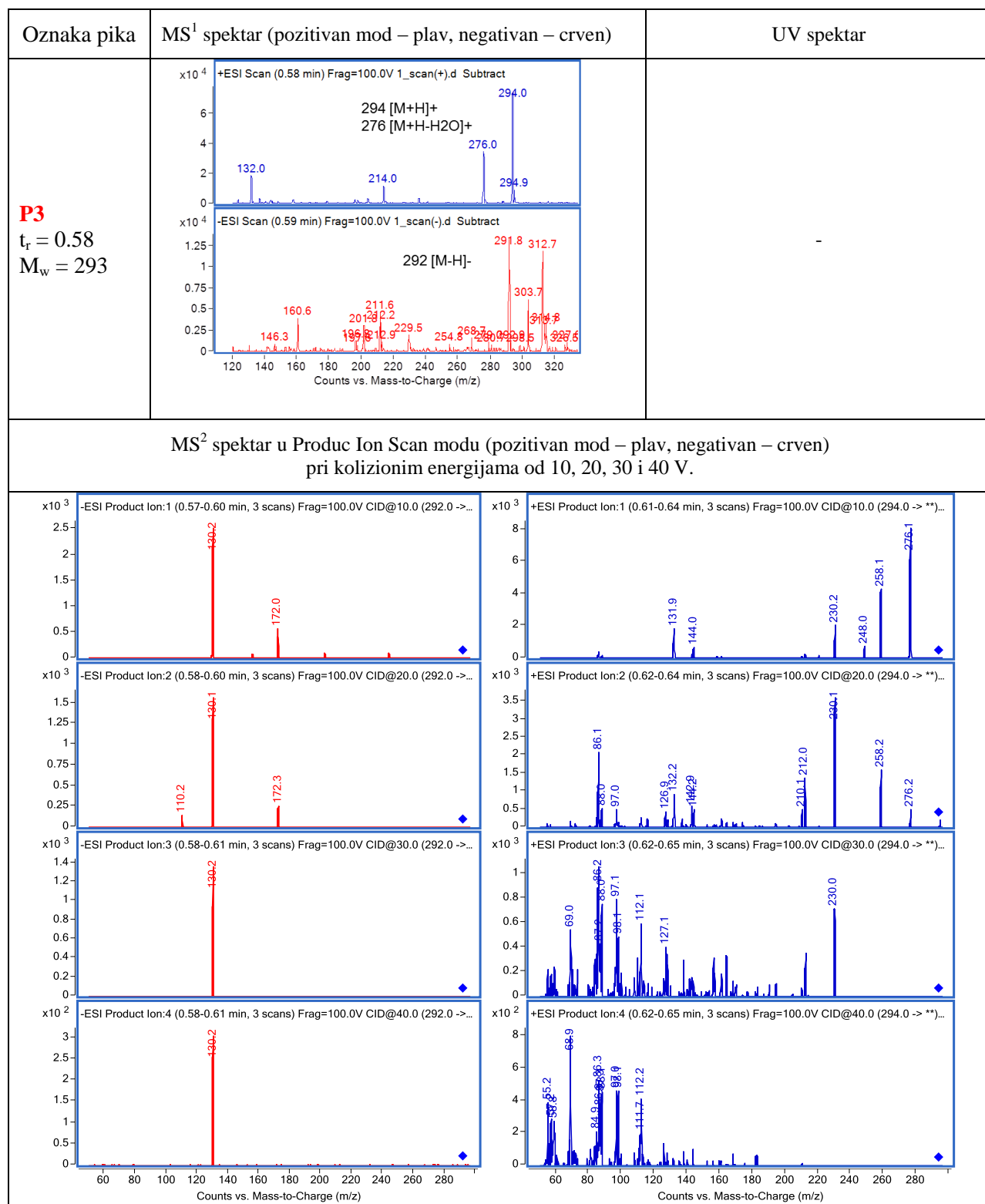
Novi Sad, 2015.

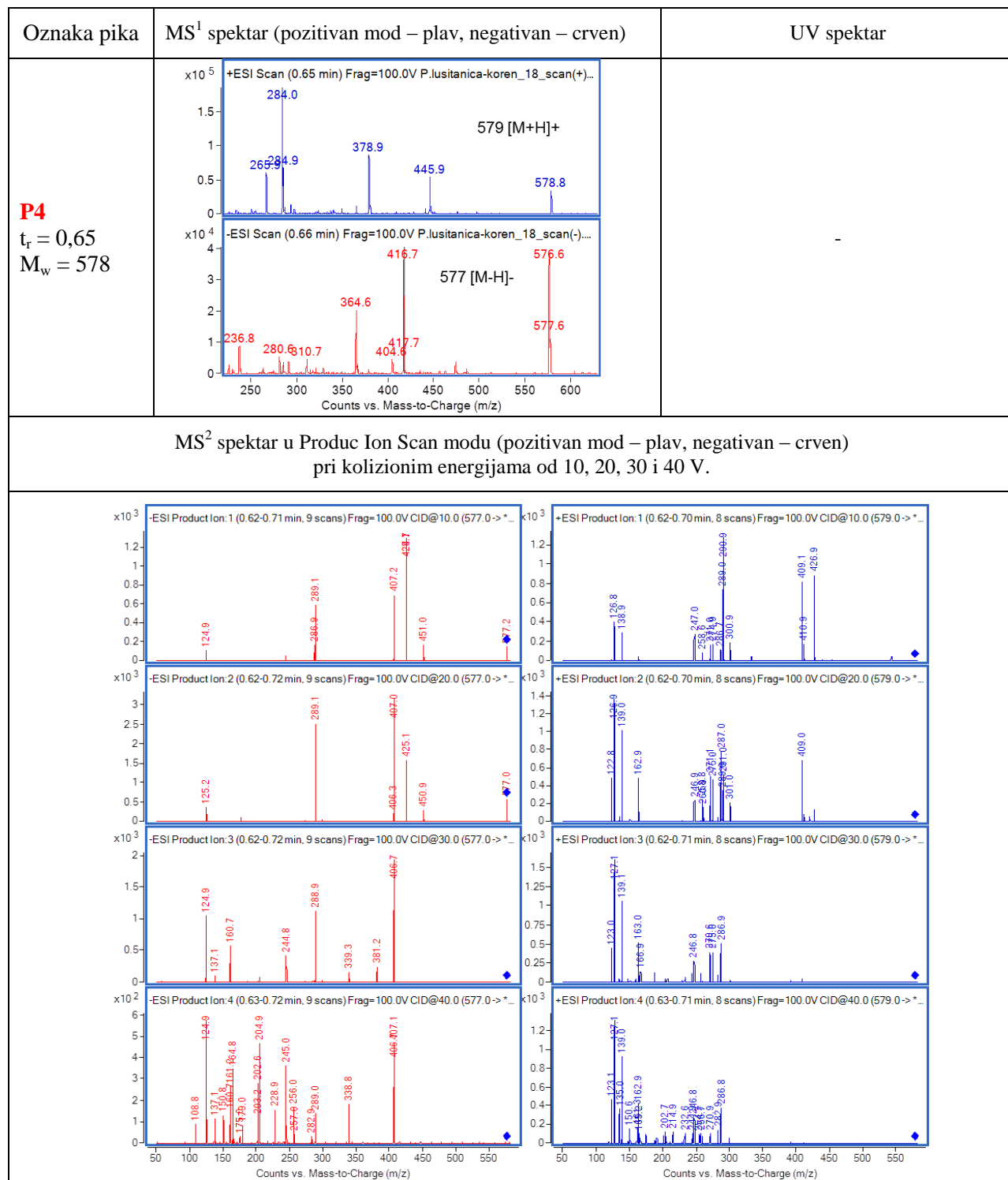
REZULTATI LC-DAD-MS I LC-MS/MS ANALIZE – slike UV, MS¹ i MS² spektara


Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P2 $t_r = 0.52$ $M_w = 192$		-

MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven)
 pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.

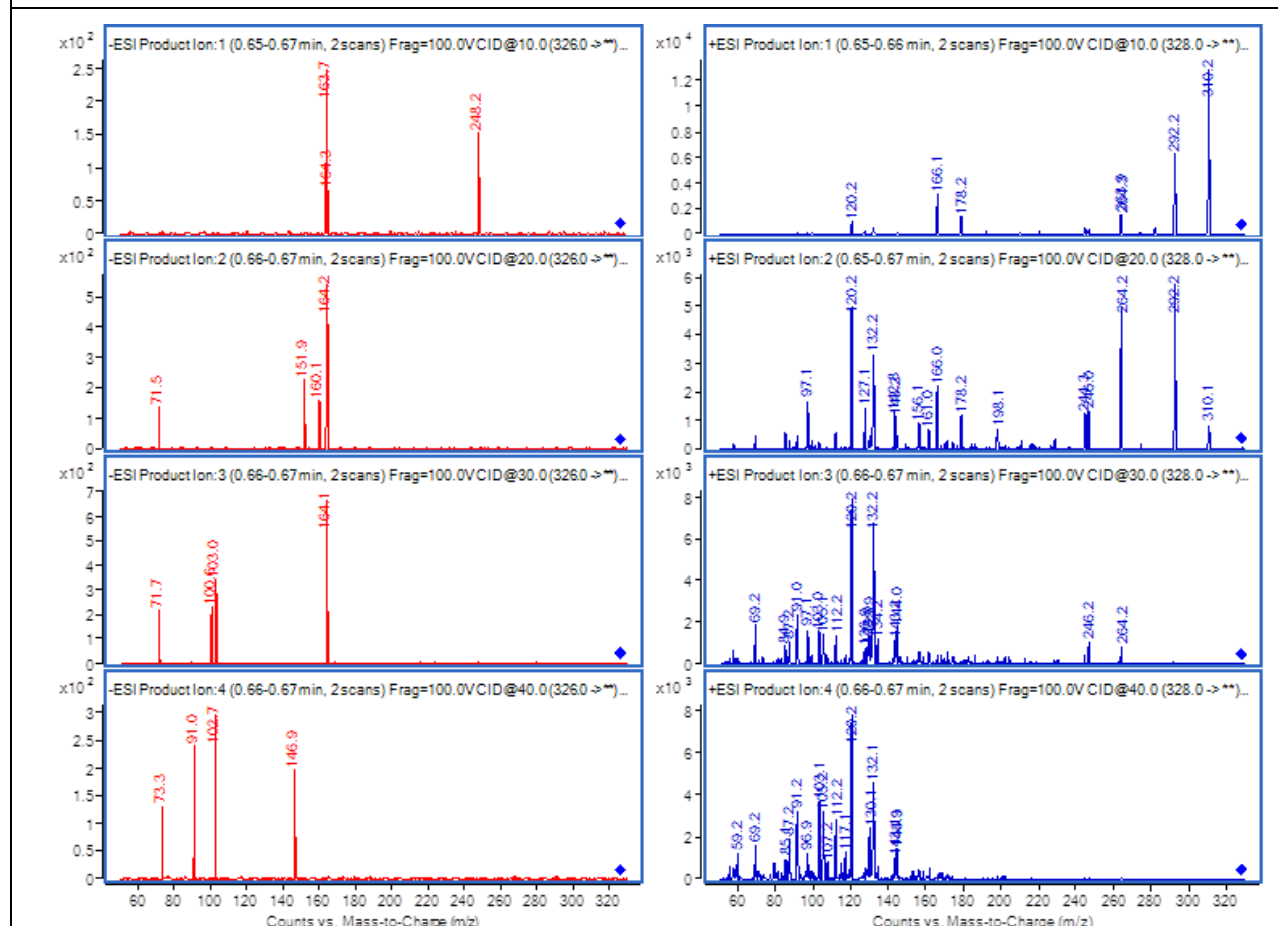


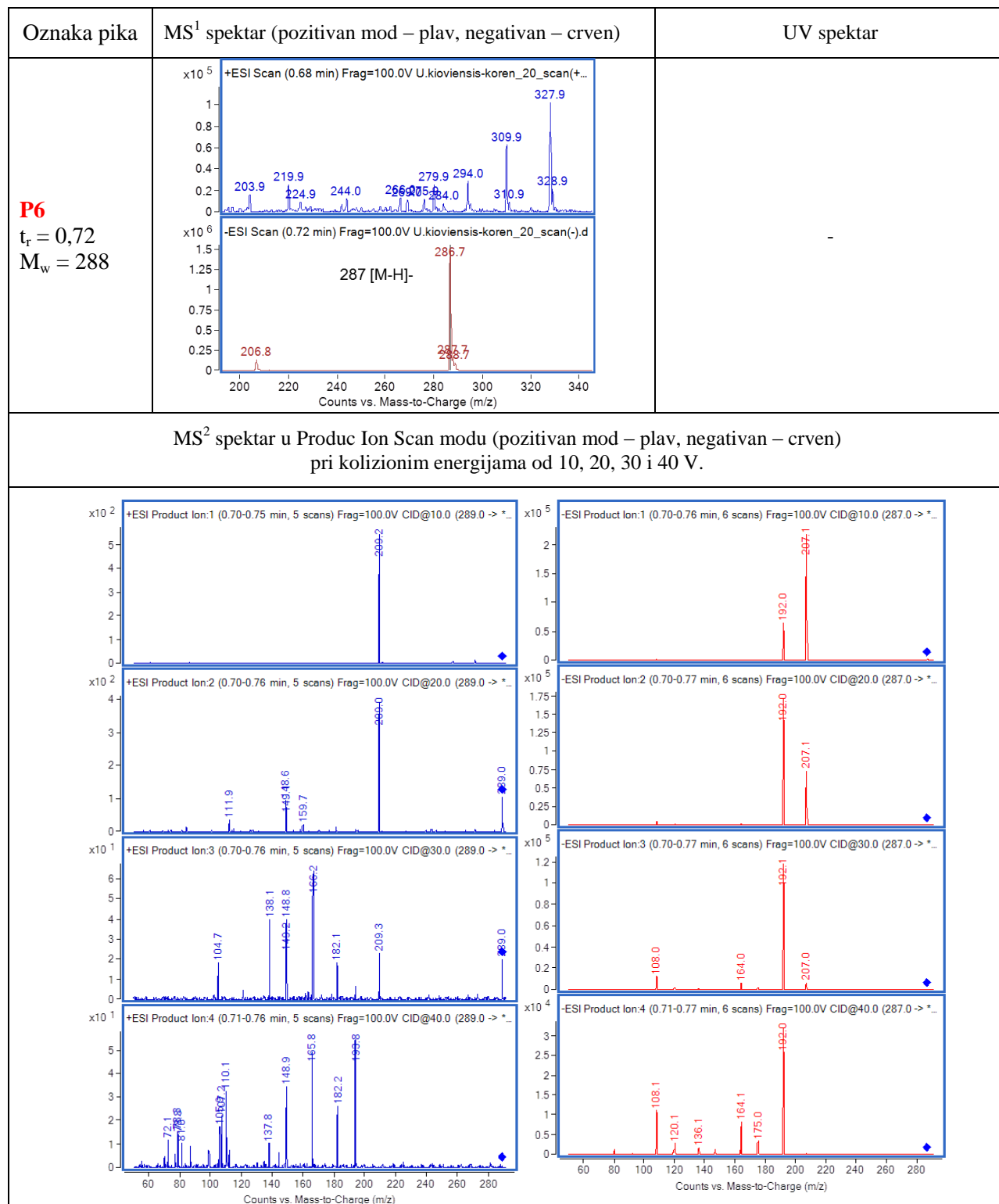


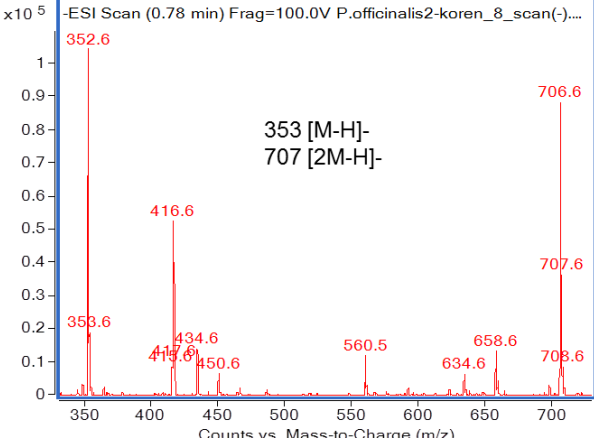
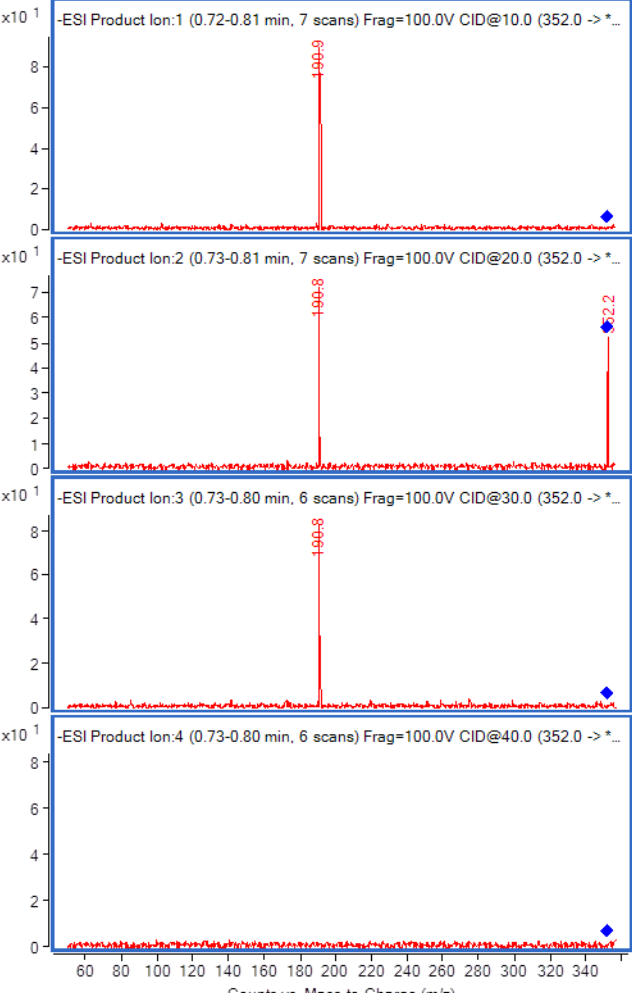


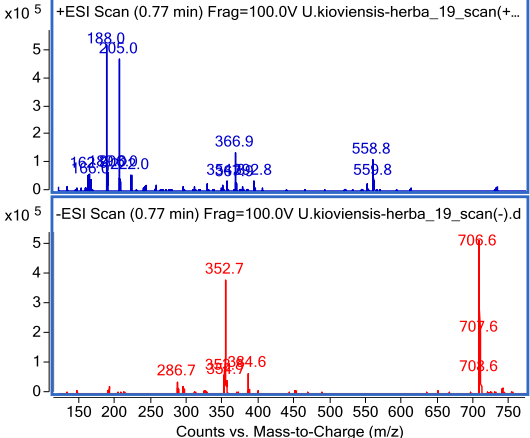
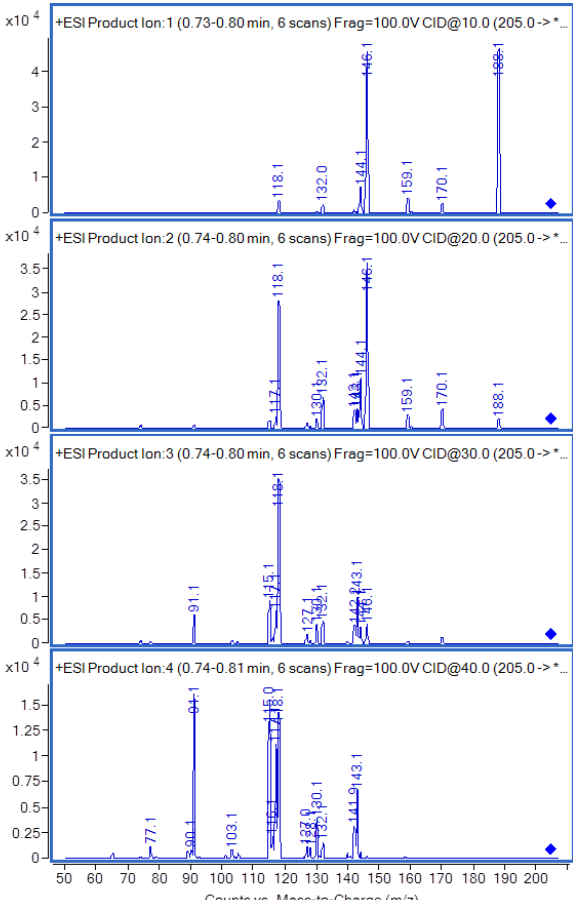
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P5 $t_r = 0,69$ $M_w = 327$		-

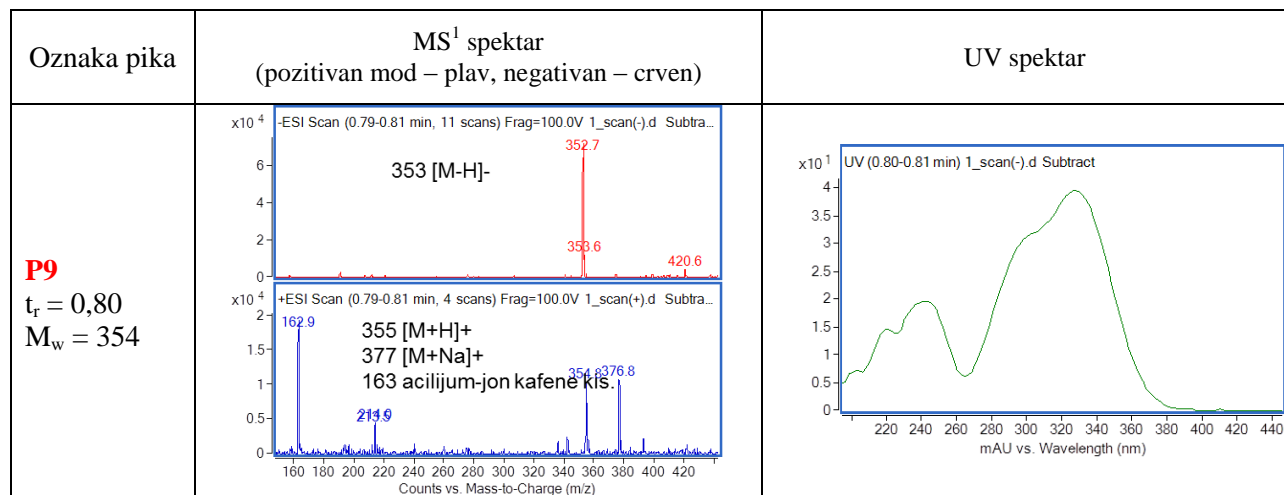
MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven)
 pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.



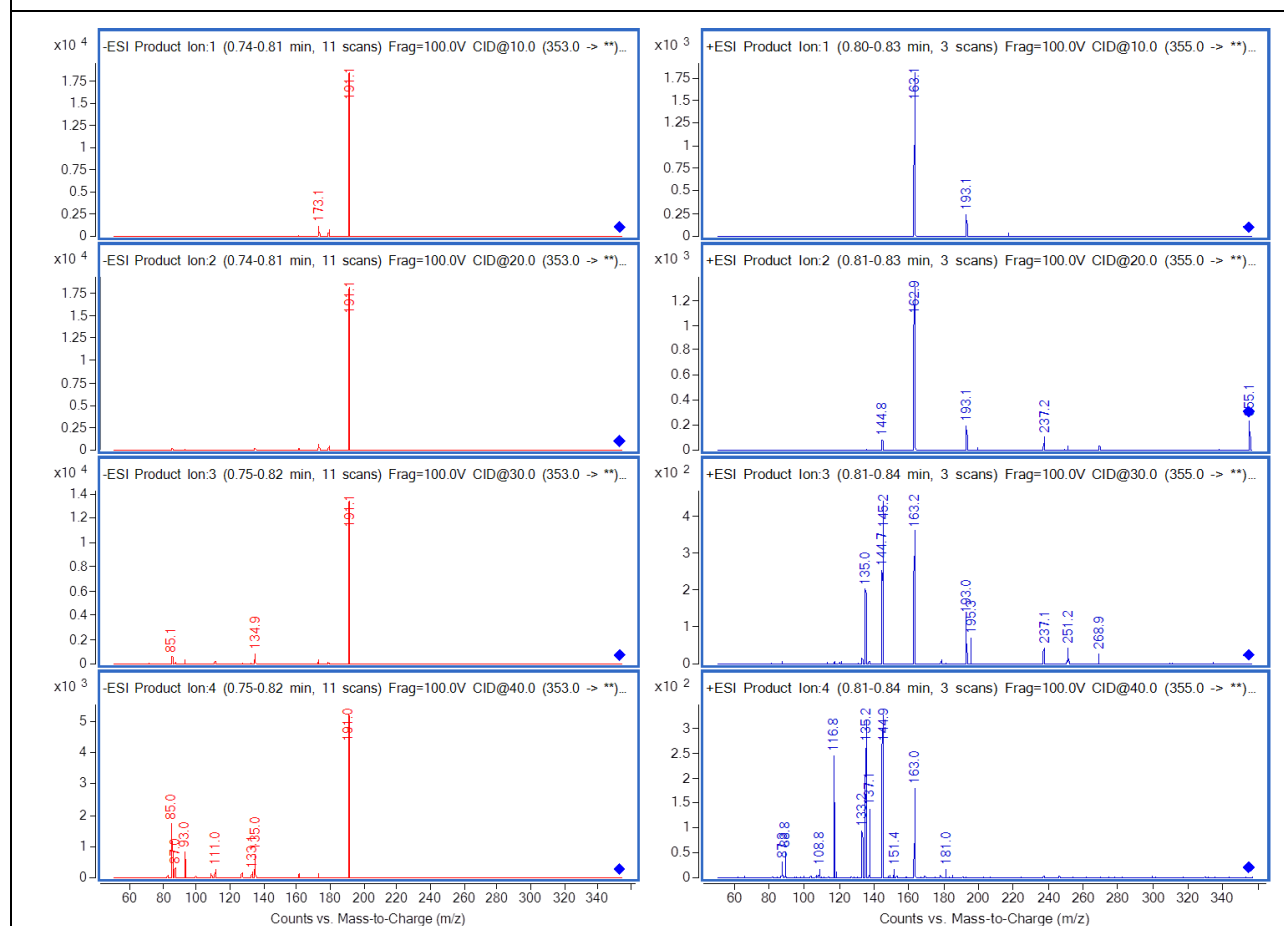


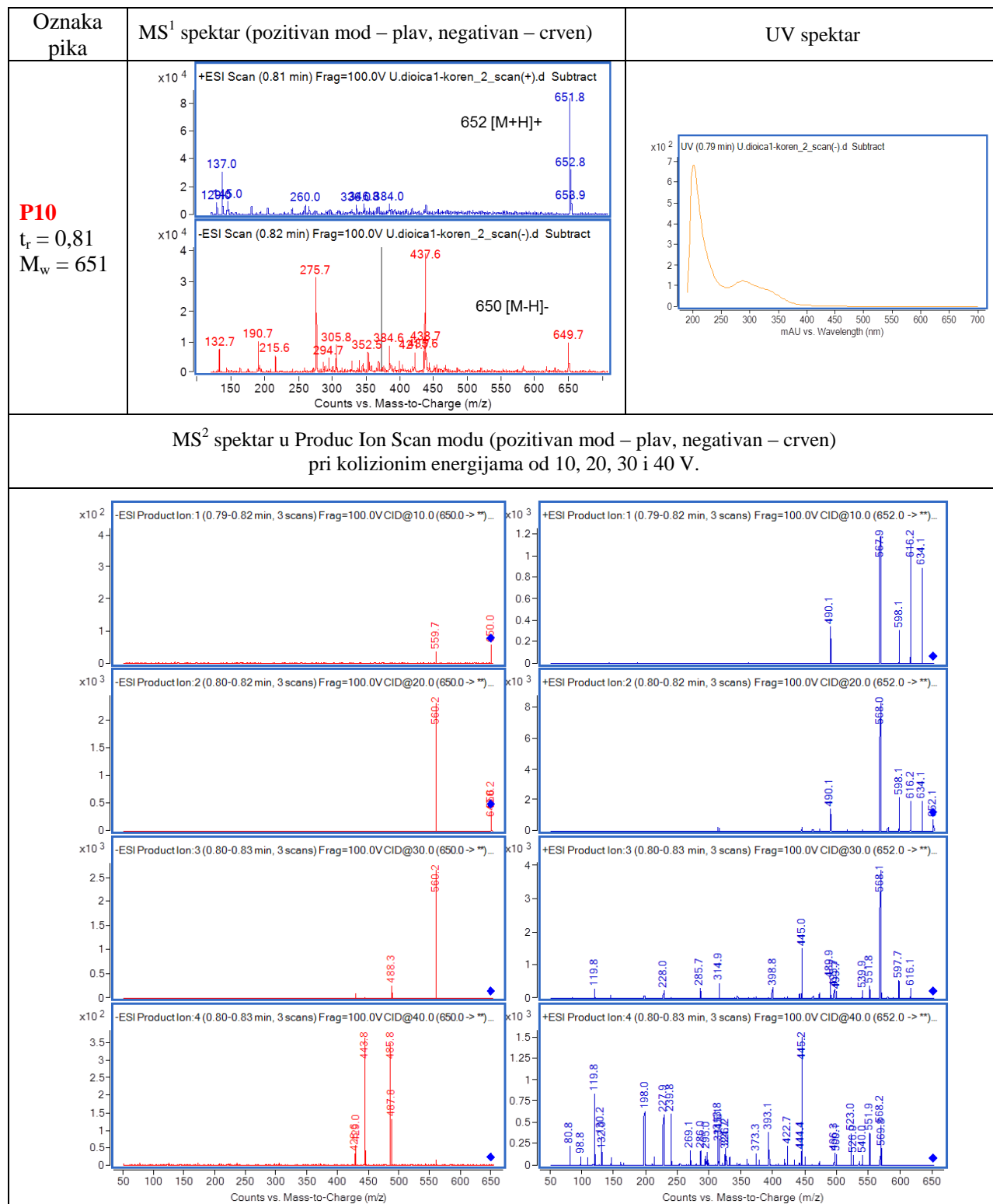
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P7 $t_r = 0,77$ $M_w = 354$</p>	 <p>-ESI Scan (0.78 min) Frag=100.0V P.officinalis2-koren_8_scan(-)....</p> <p>353 [M-H]⁻ 707 [2M-H]⁻</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	-
<p>MS² spektar u Product Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.</p>		
 <p>-ESI Product Ion:1 (0.72-0.81 min, 7 scans) Frag=100.0V CID@10.0 (352.0 -> *...)</p> <p>-ESI Product Ion:2 (0.73-0.81 min, 7 scans) Frag=100.0V CID@20.0 (352.0 -> *...)</p> <p>-ESI Product Ion:3 (0.73-0.80 min, 6 scans) Frag=100.0V CID@30.0 (352.0 -> *...)</p> <p>-ESI Product Ion:4 (0.73-0.80 min, 6 scans) Frag=100.0V CID@40.0 (352.0 -> *...)</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>		

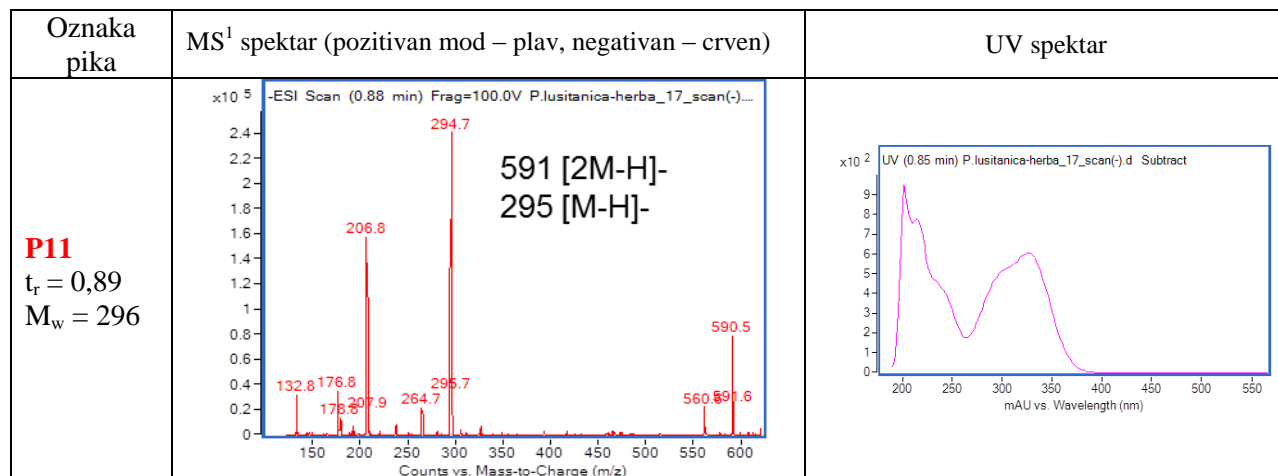
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P8 $t_r = 0,77$ $M_w = 204$</p>		-
<p>MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.</p>		
		



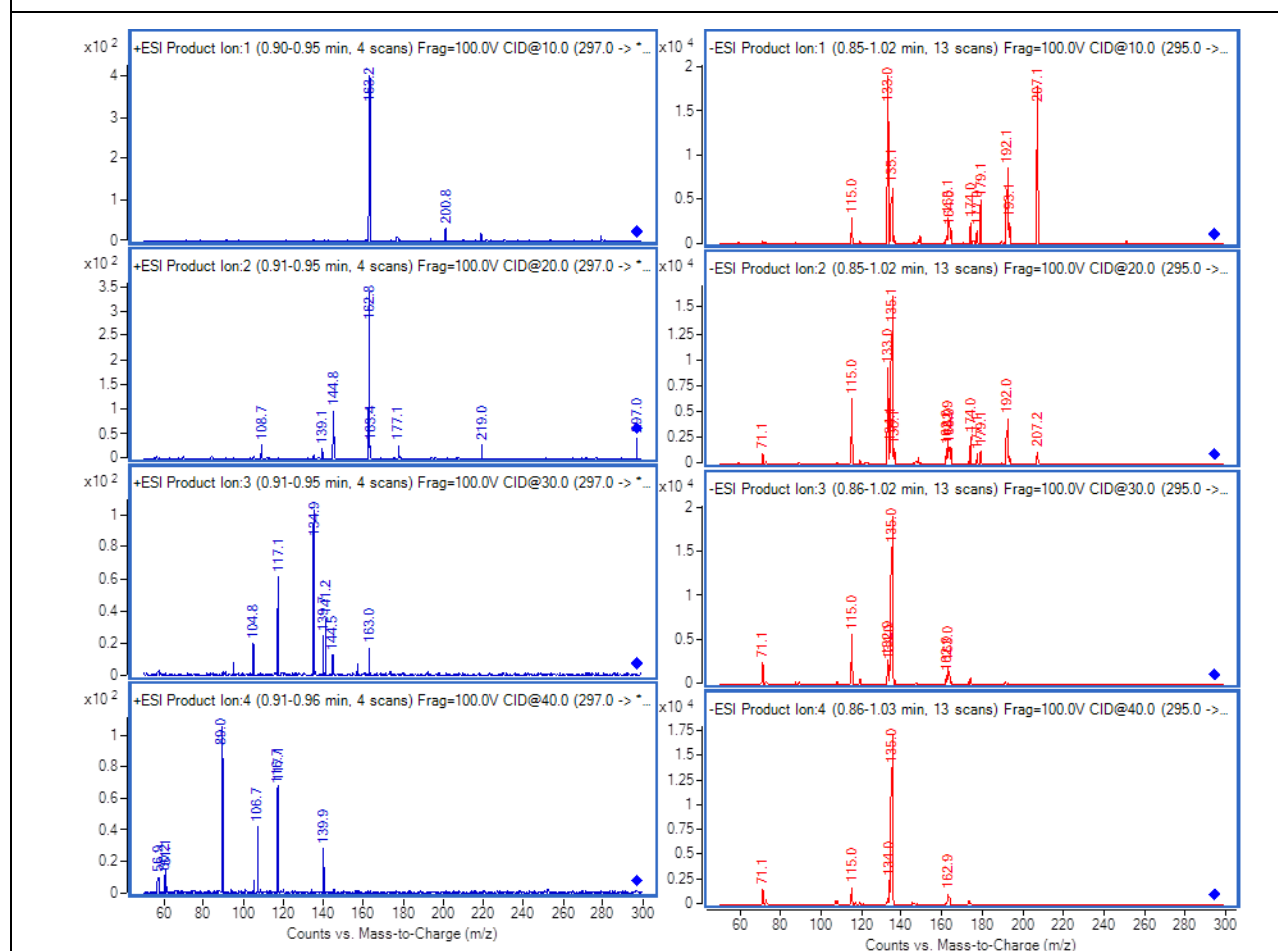
MS² spektar u Product Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven)
pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.

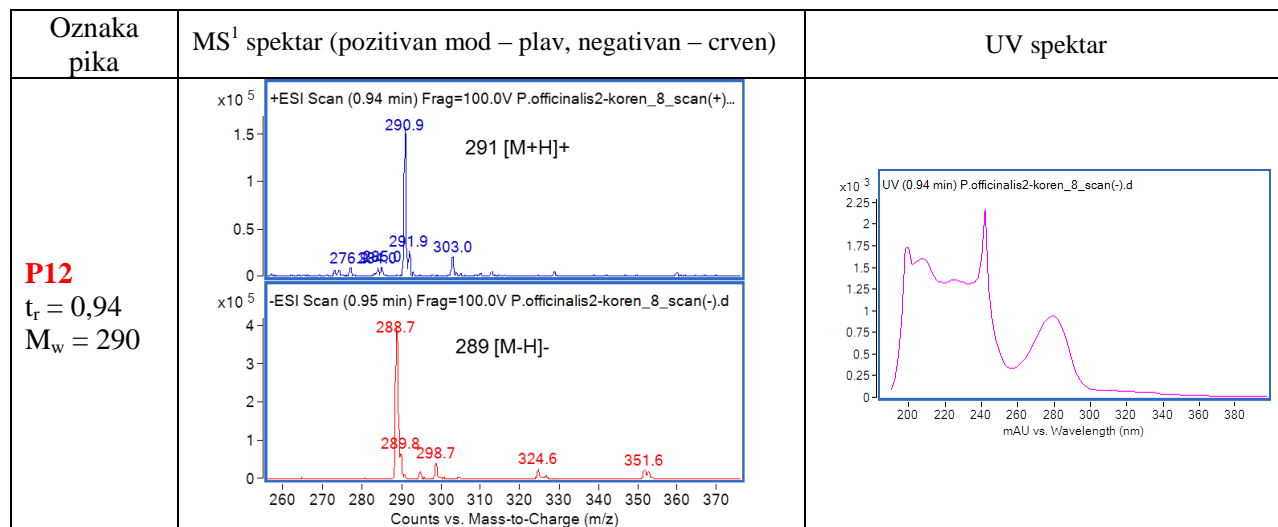




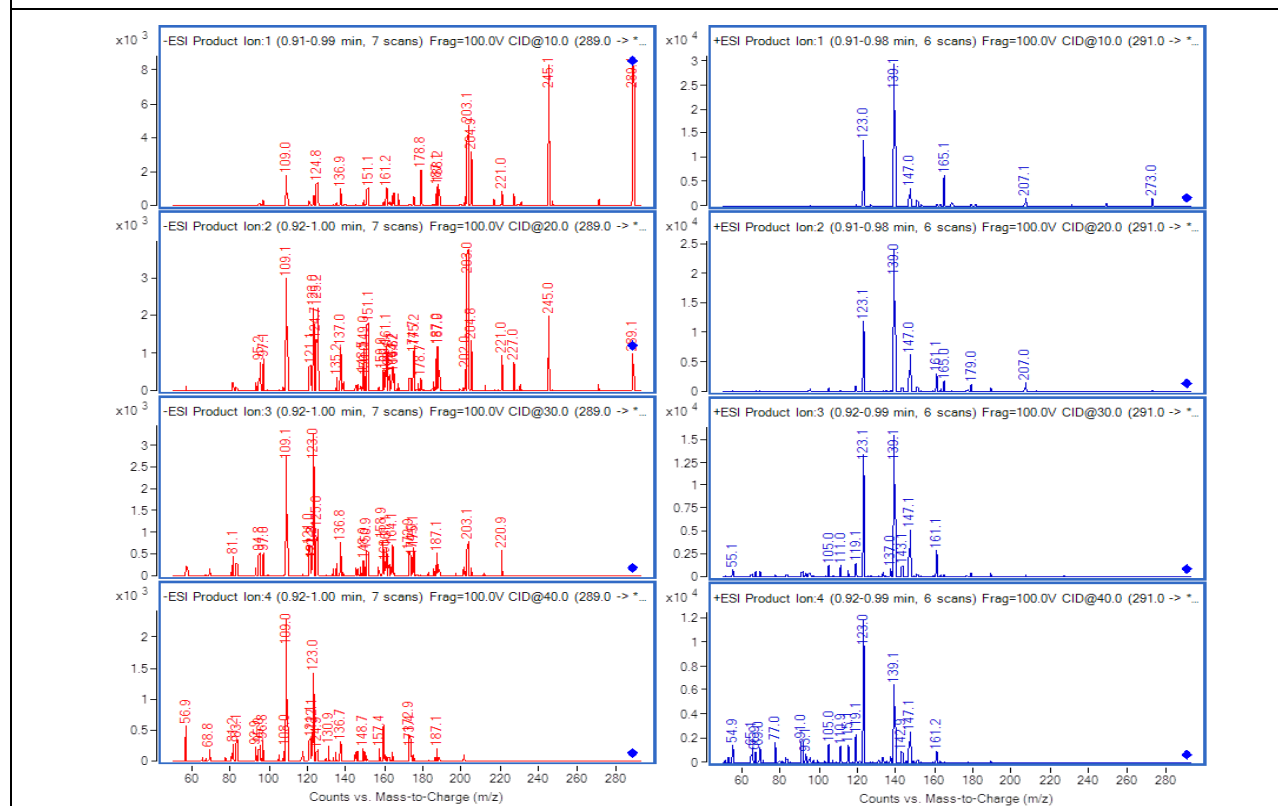


MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.

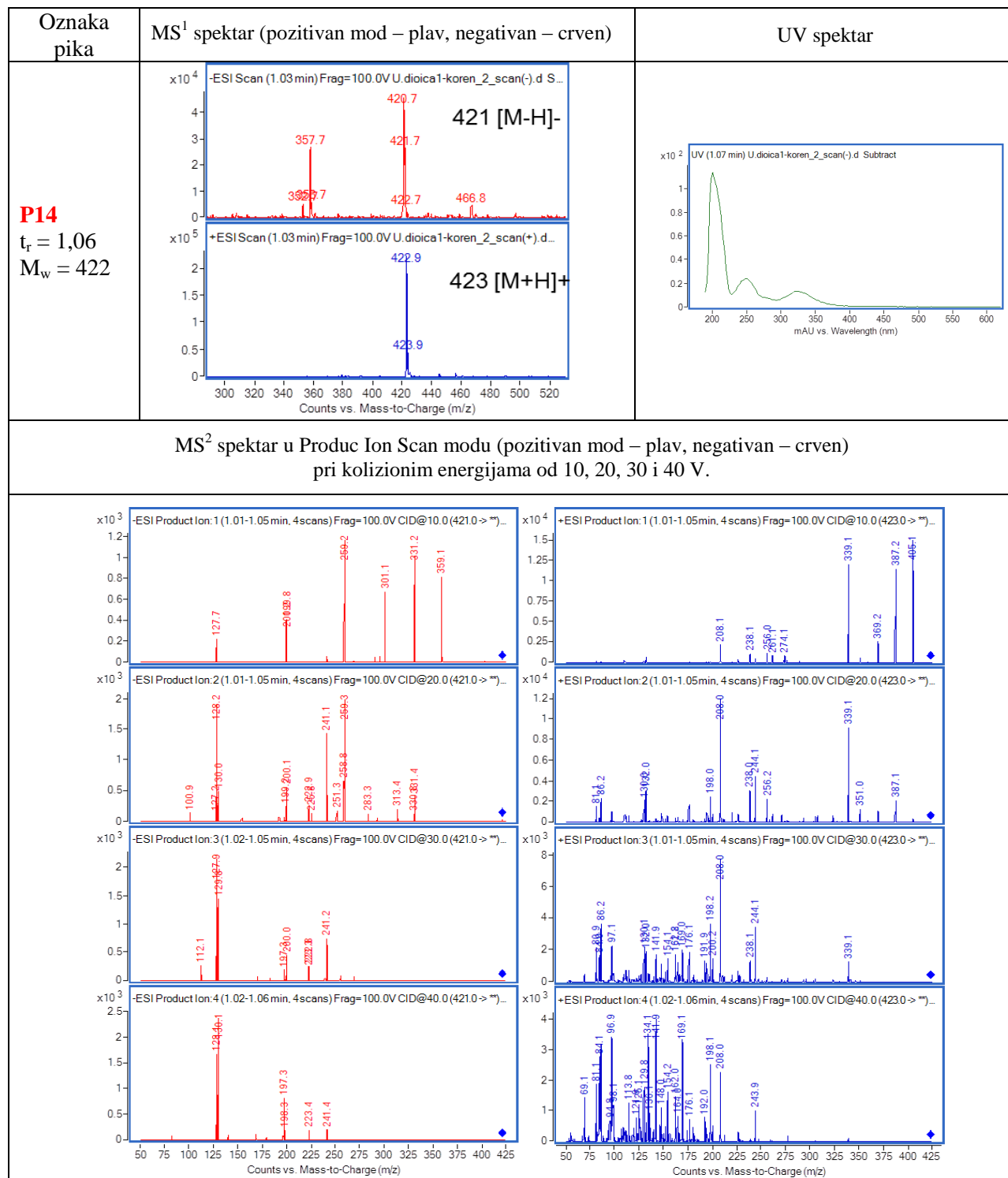


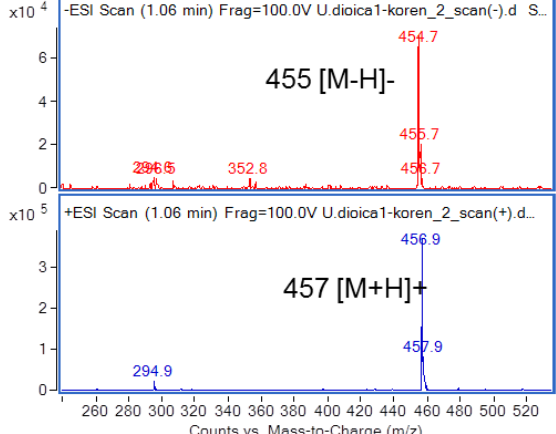


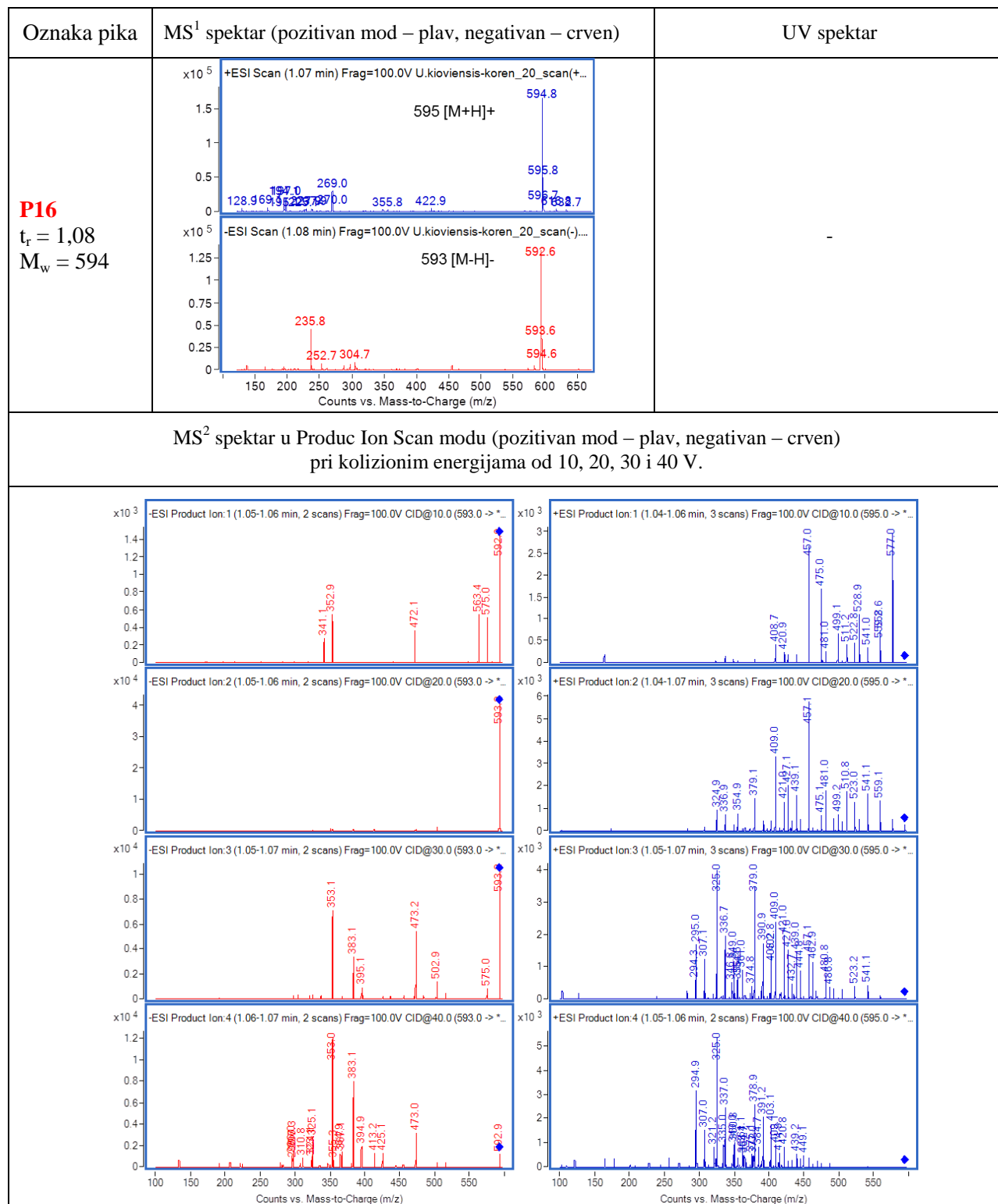
MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.

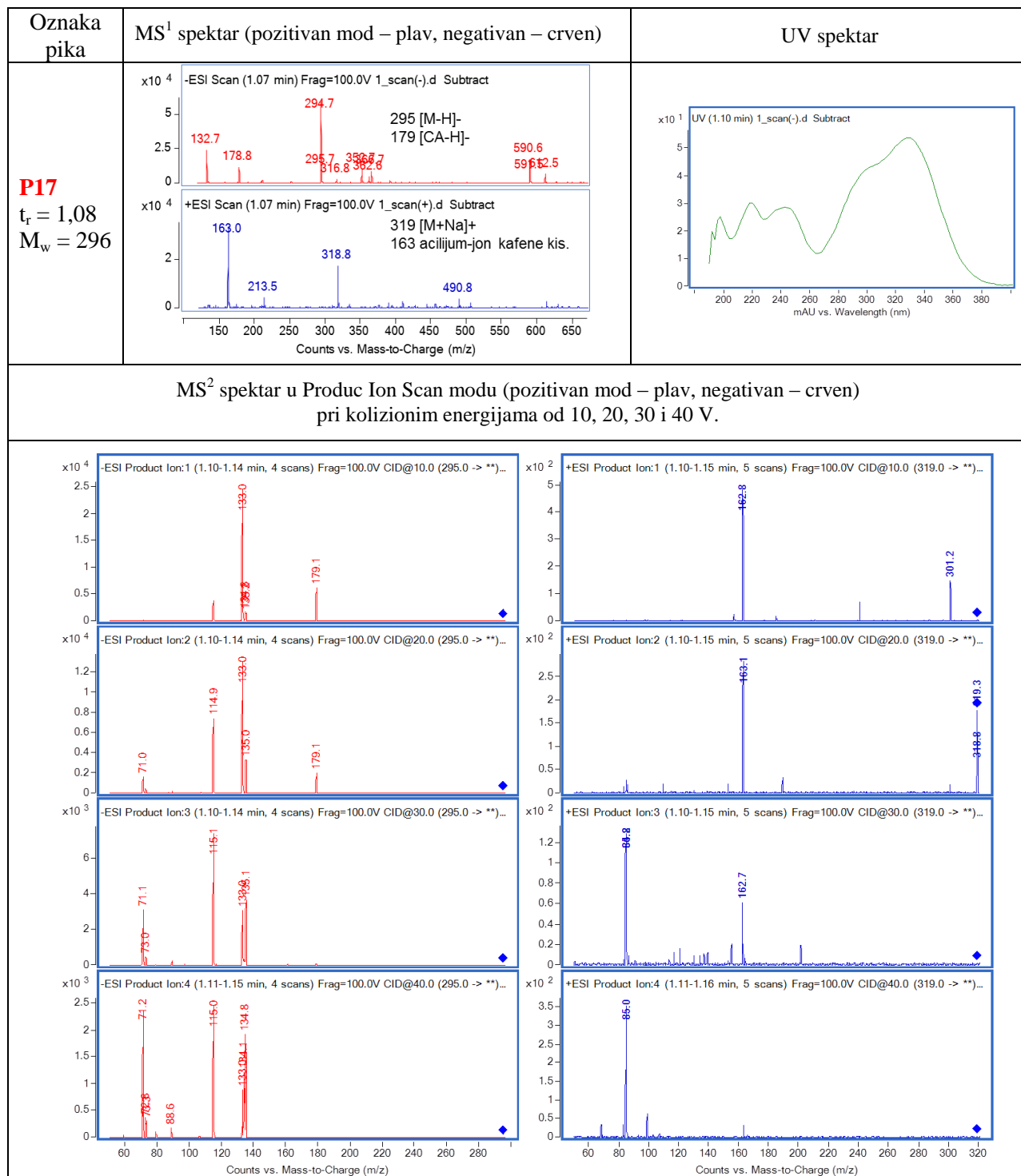


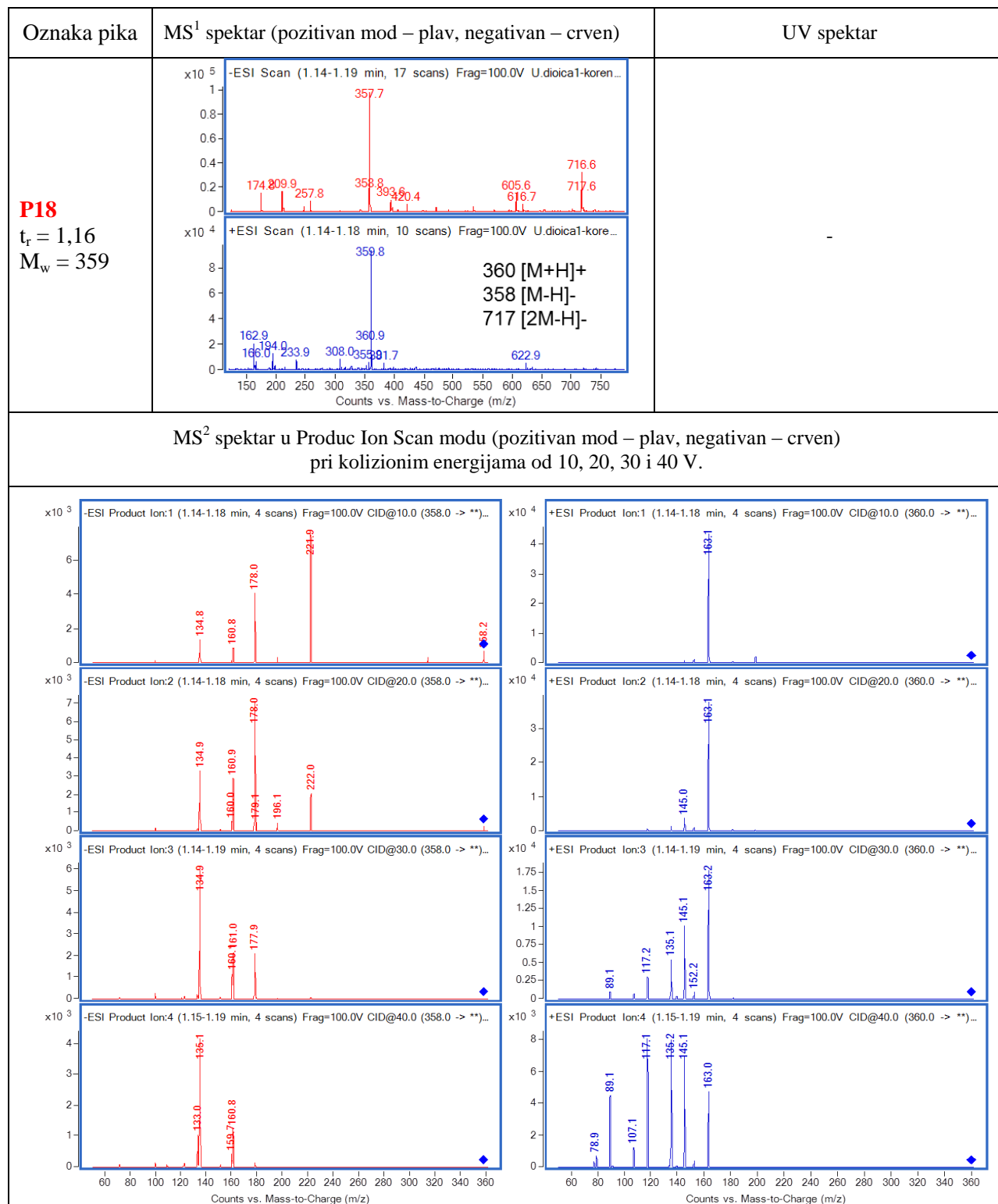
Oznaka pika	
P13 $t_r = 0,97$ $M_w = 296$	Isti UV, MS ¹ i MS ² spektri kao P11

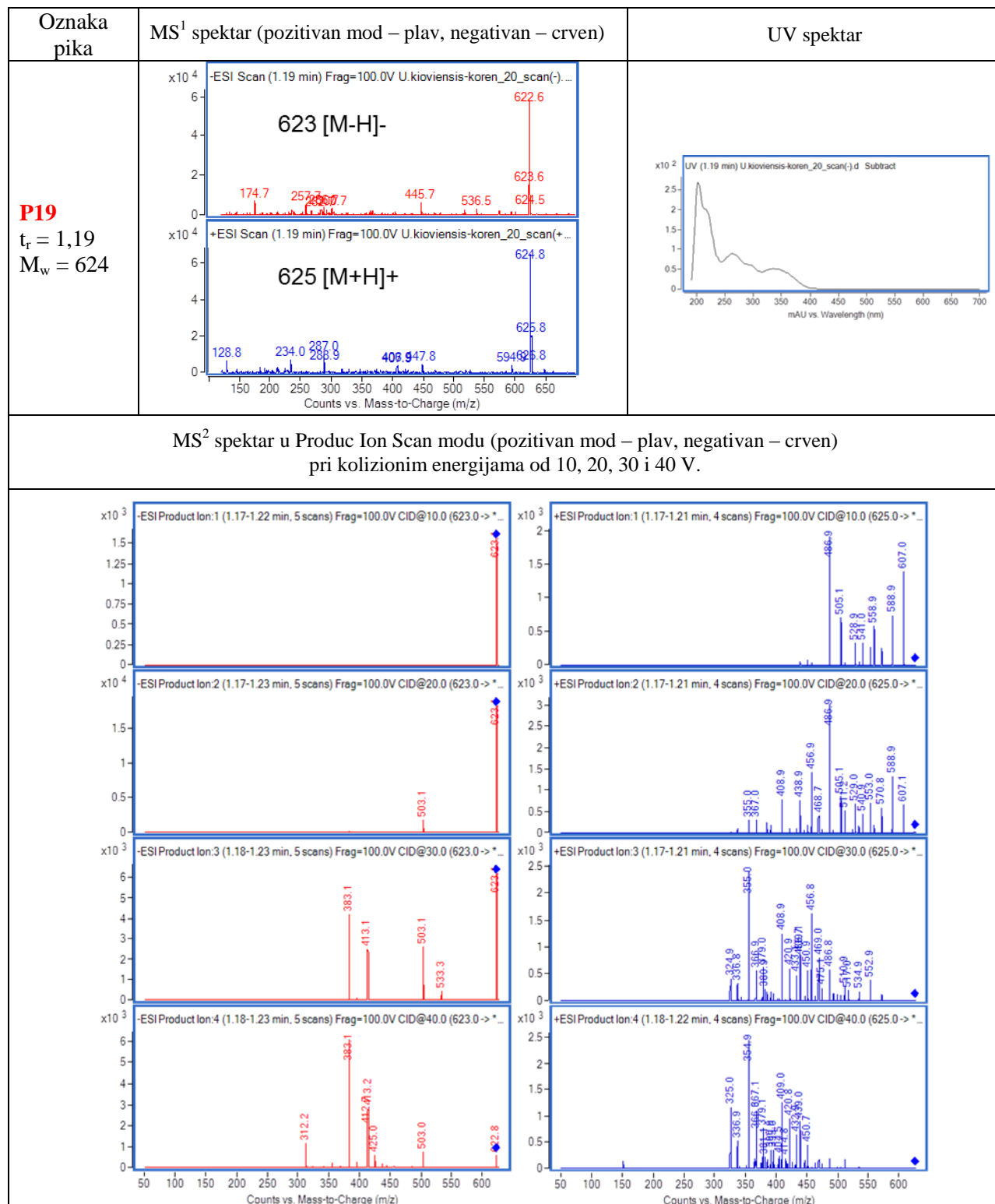


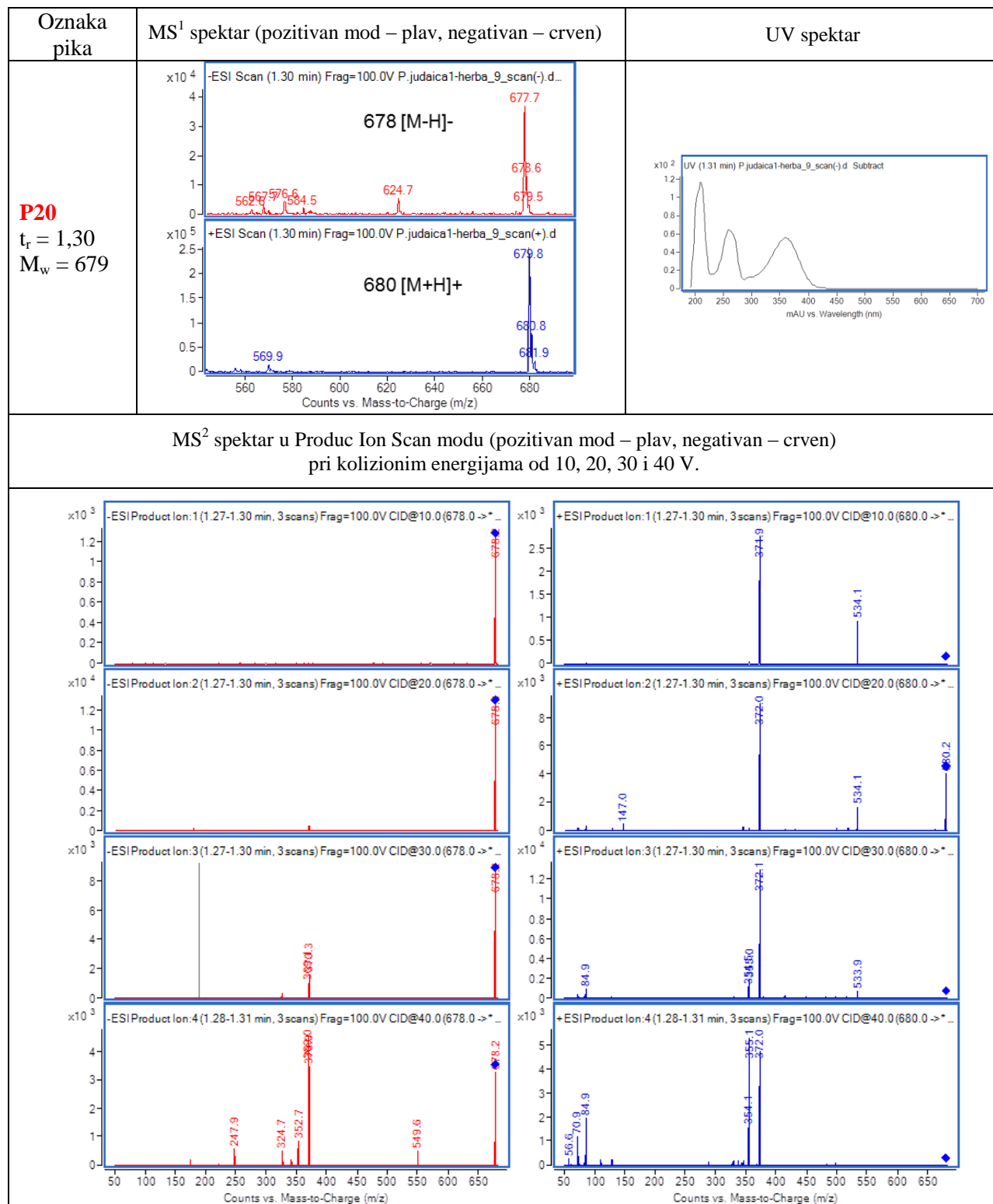
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P15 $t_r = 1,06$ $M_w = 456$</p>	 <p>-ESI Scan (1.06 min) Frag=100.0V U.dioica1-koren_2_scan(-).d S...</p> <p>455 [M-H]⁻</p> <p>+ESI Scan (1.06 min) Frag=100.0V U.dioica1-koren_2_scan(+).d...</p> <p>457 [M+H]⁺</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	-
<p>MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.</p>		
-		

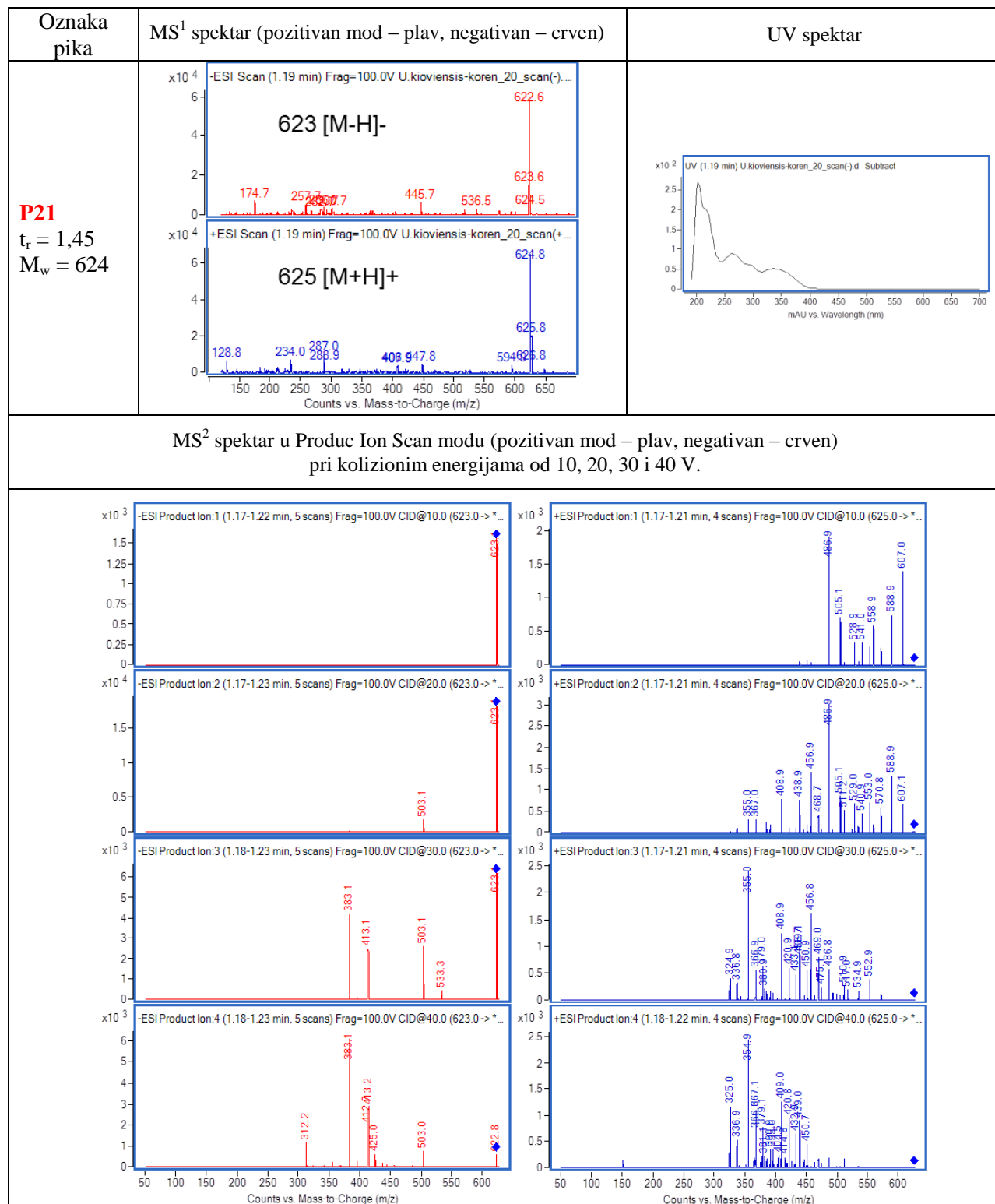








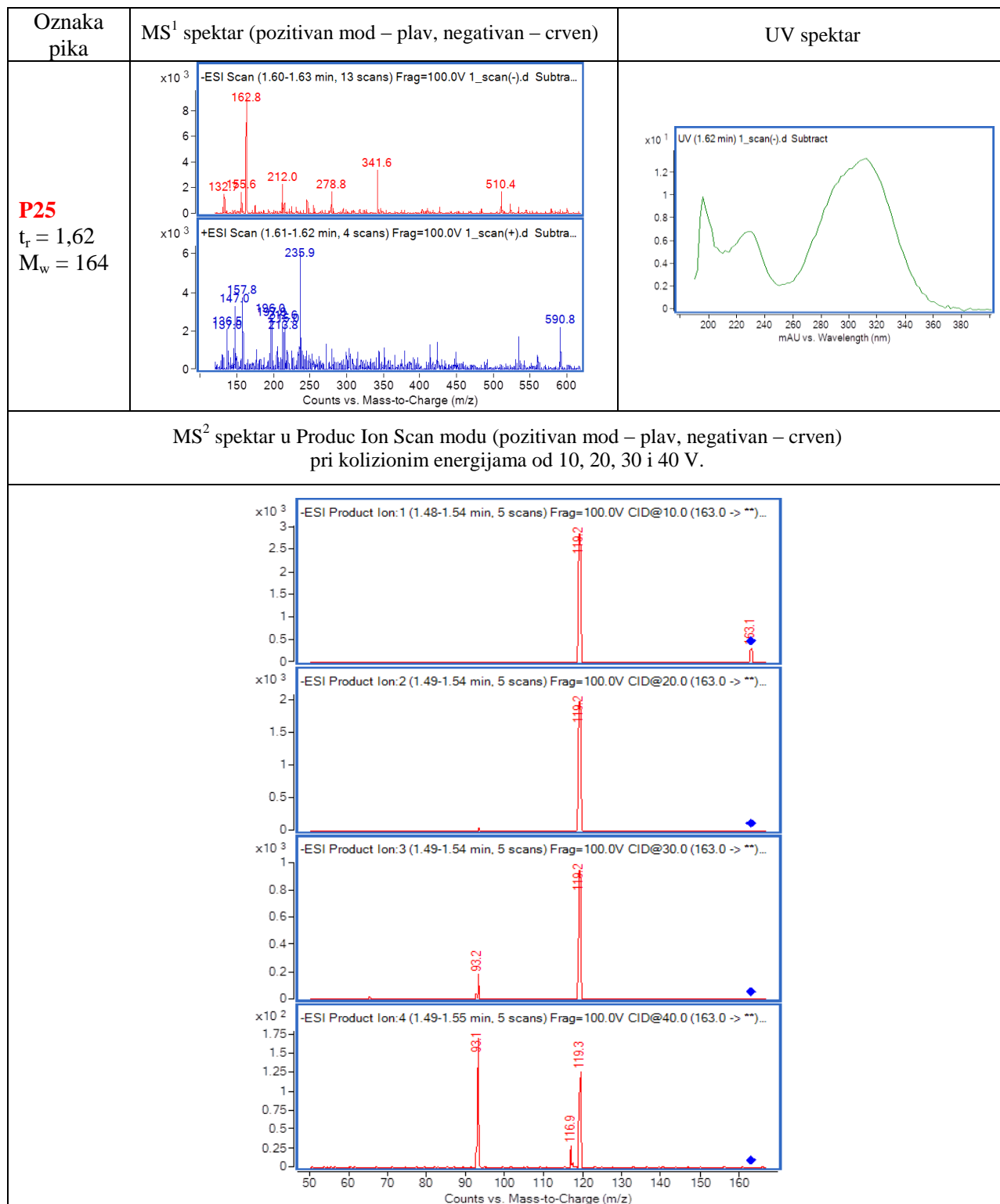


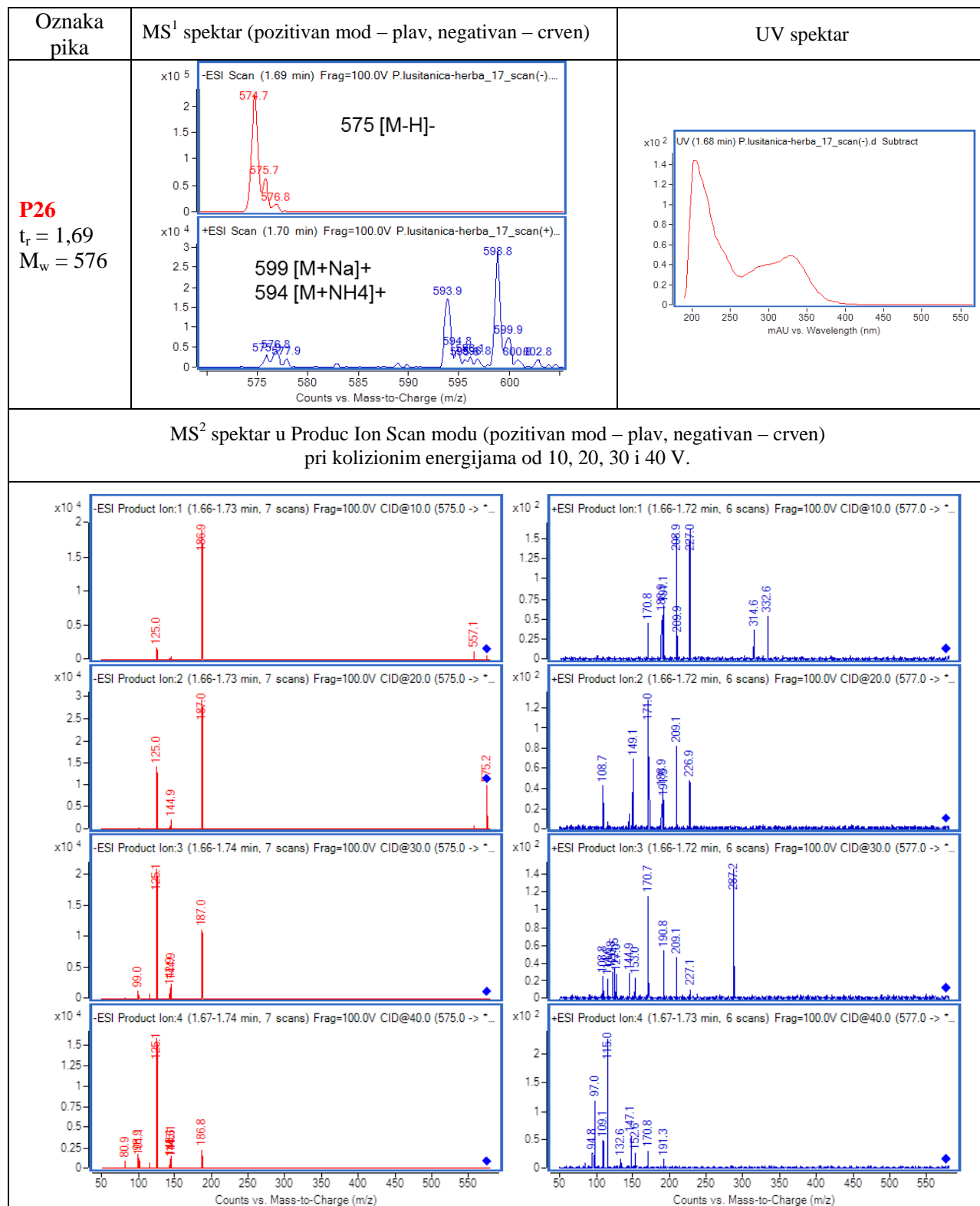


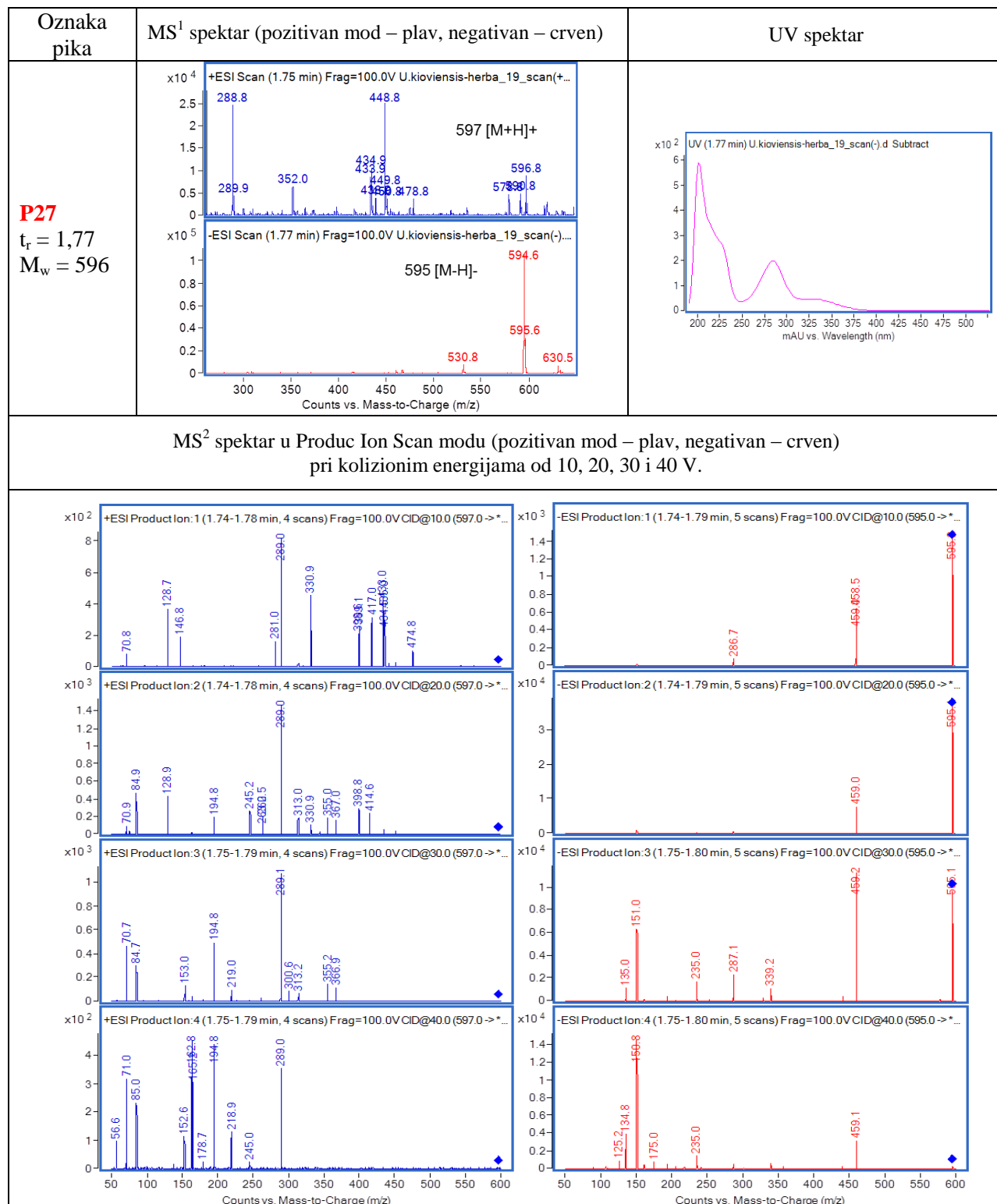
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P22 $t_r = 1,47$ $M_w = 388$		-
MS ² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		
-		

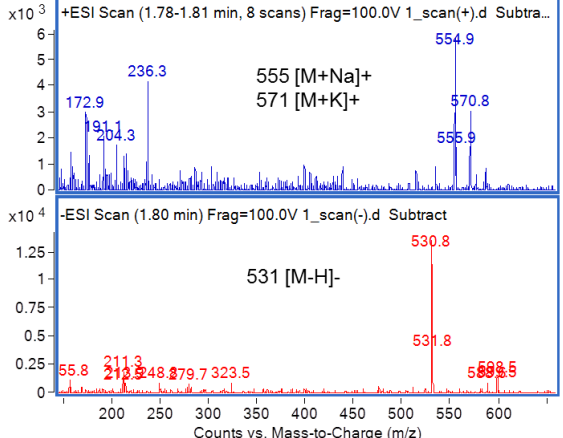
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P23 $t_r = 1,52$ $M_w = 354$		-
MS ² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		
-		

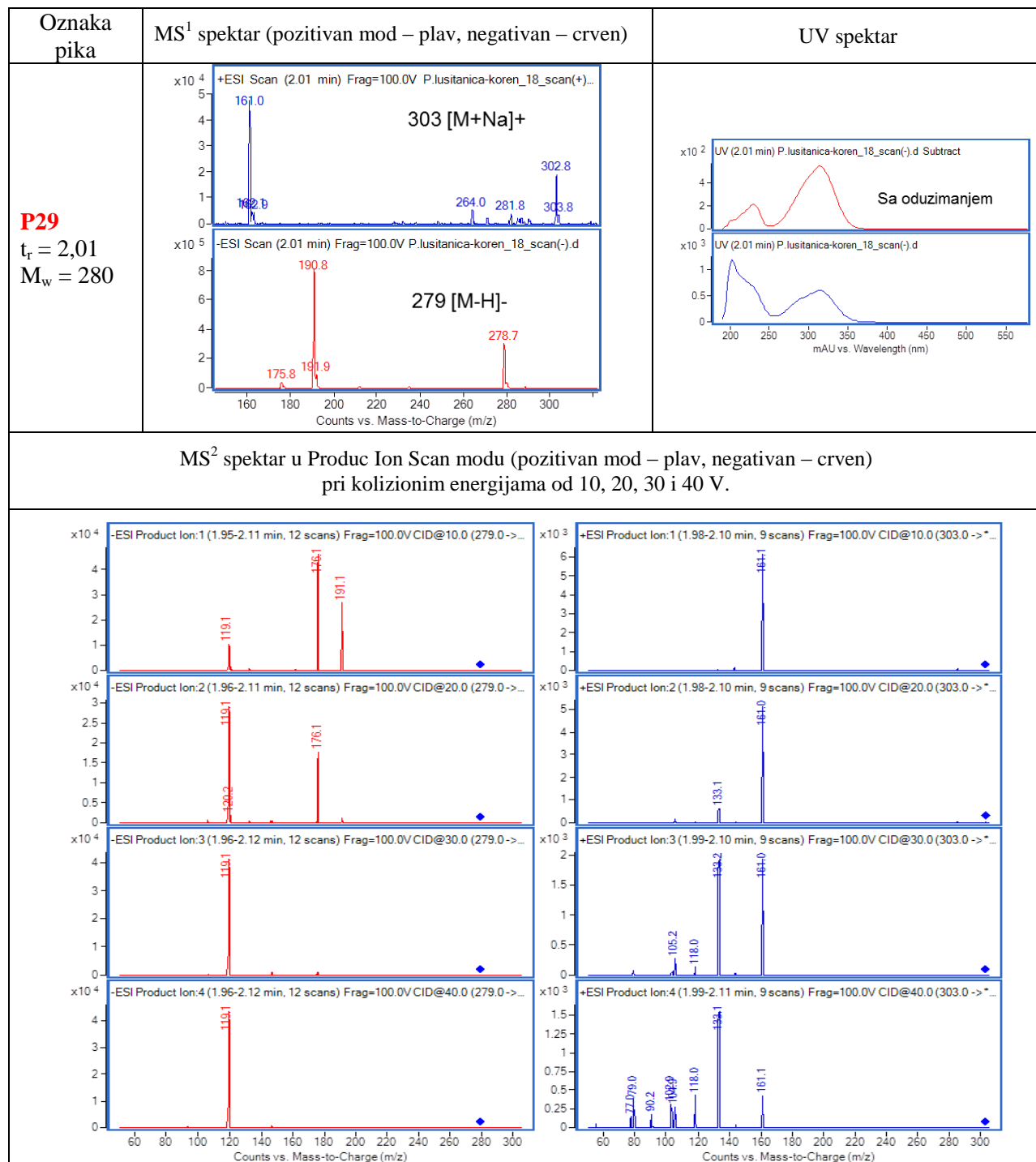
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P24 $t_r = 1,52$ $M_w = 448$		-
MS ² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		

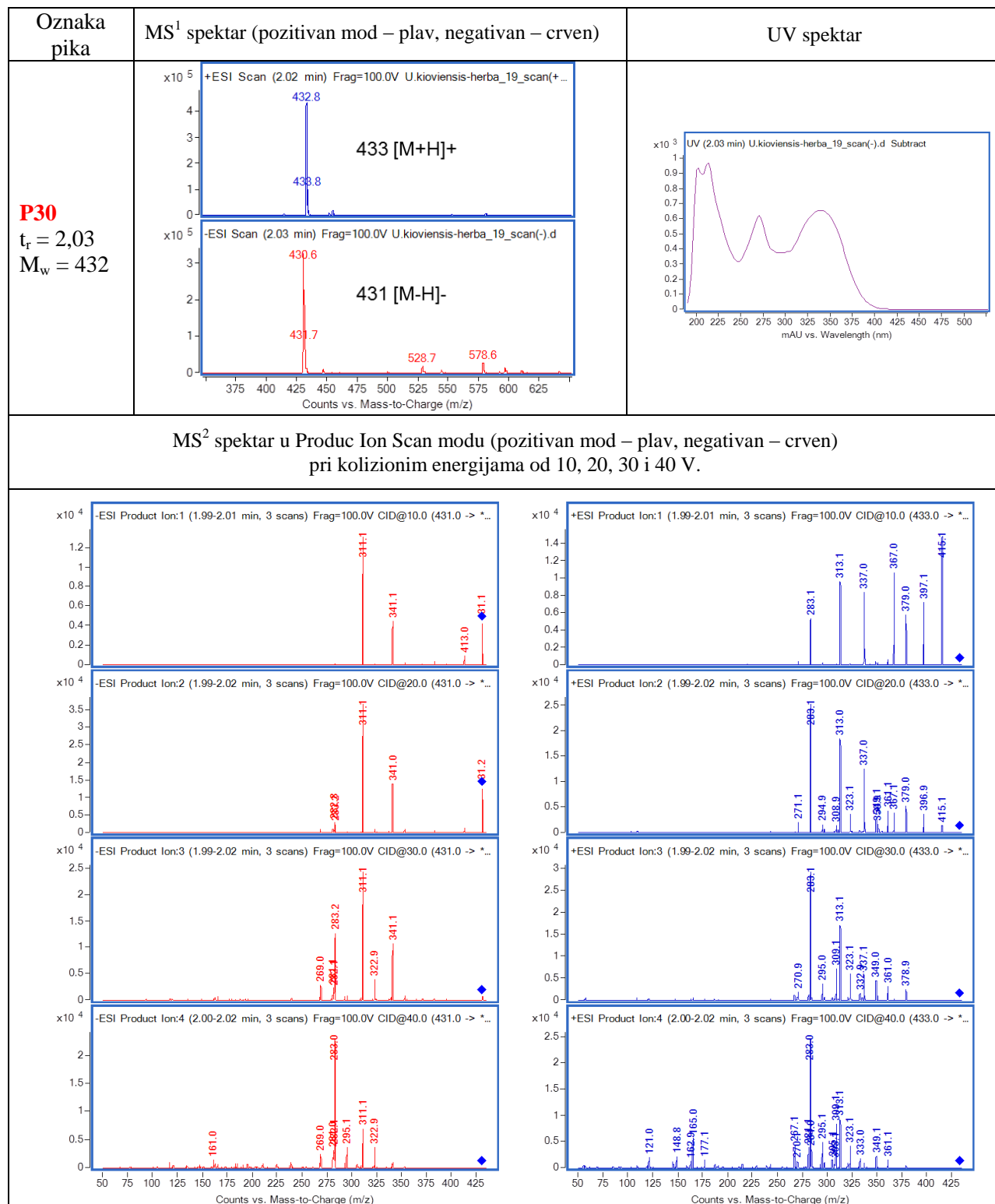


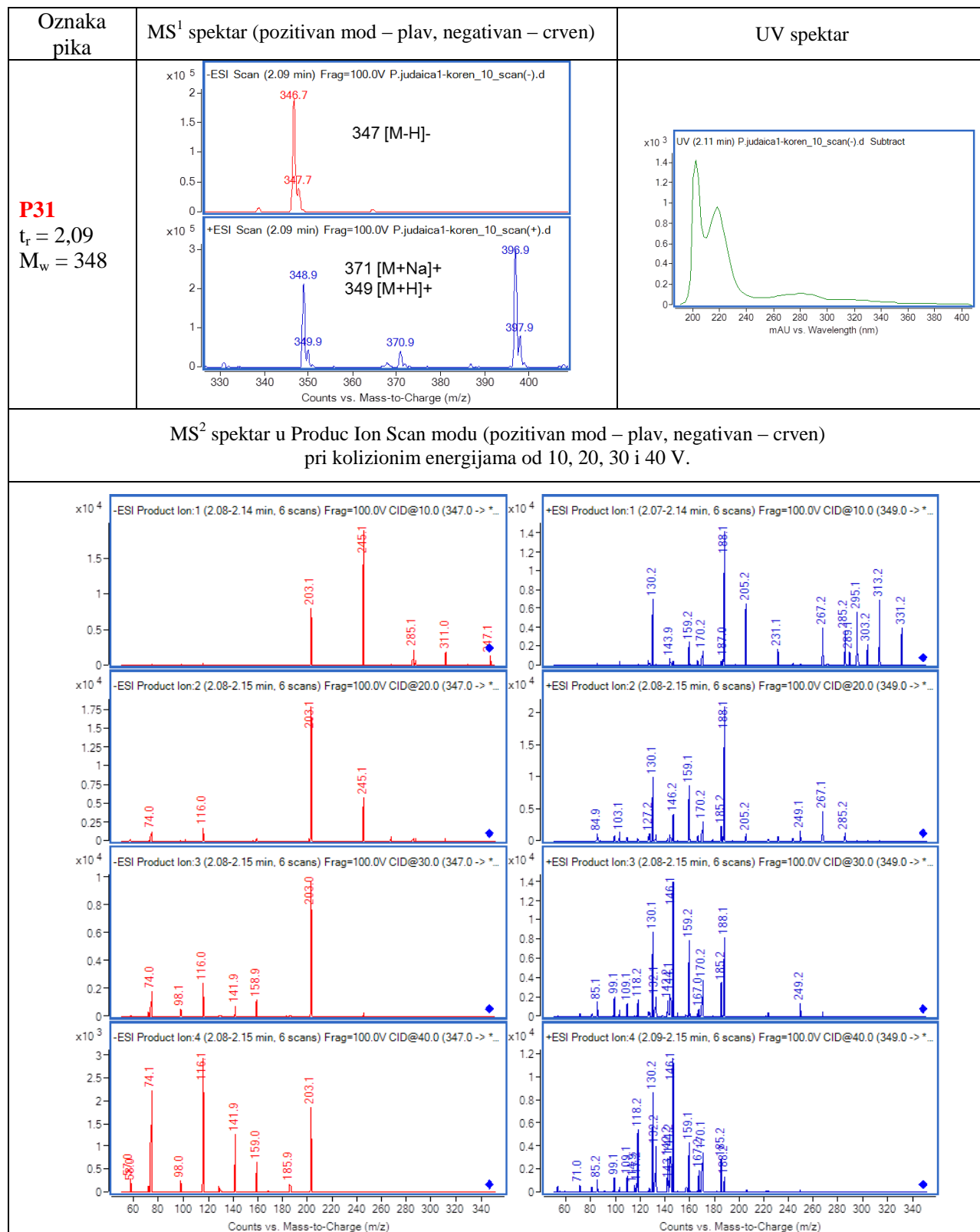




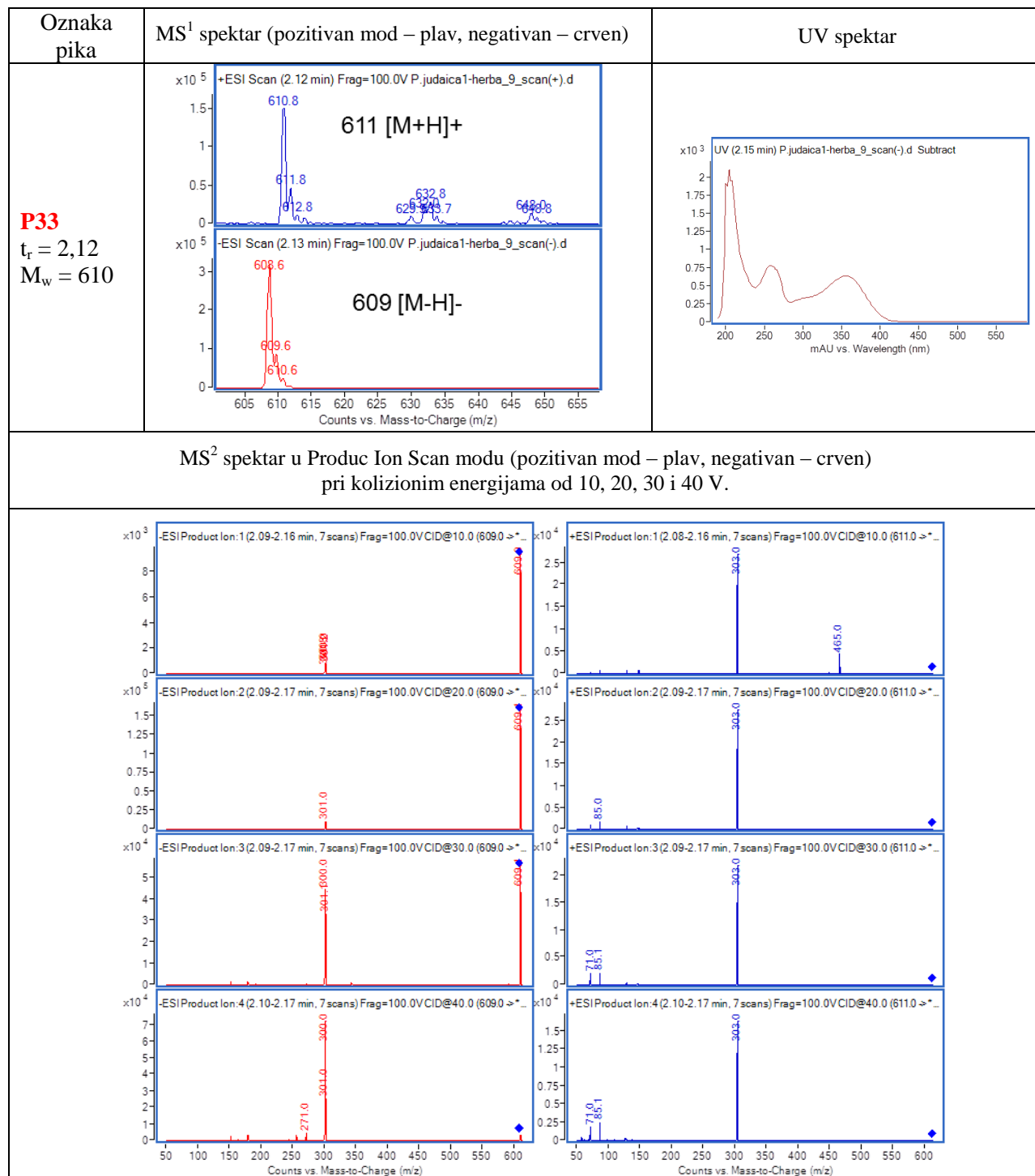
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P28 $t_r = 1,80$ $M_w = 554$</p>		-
<p>MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.</p>		
-		

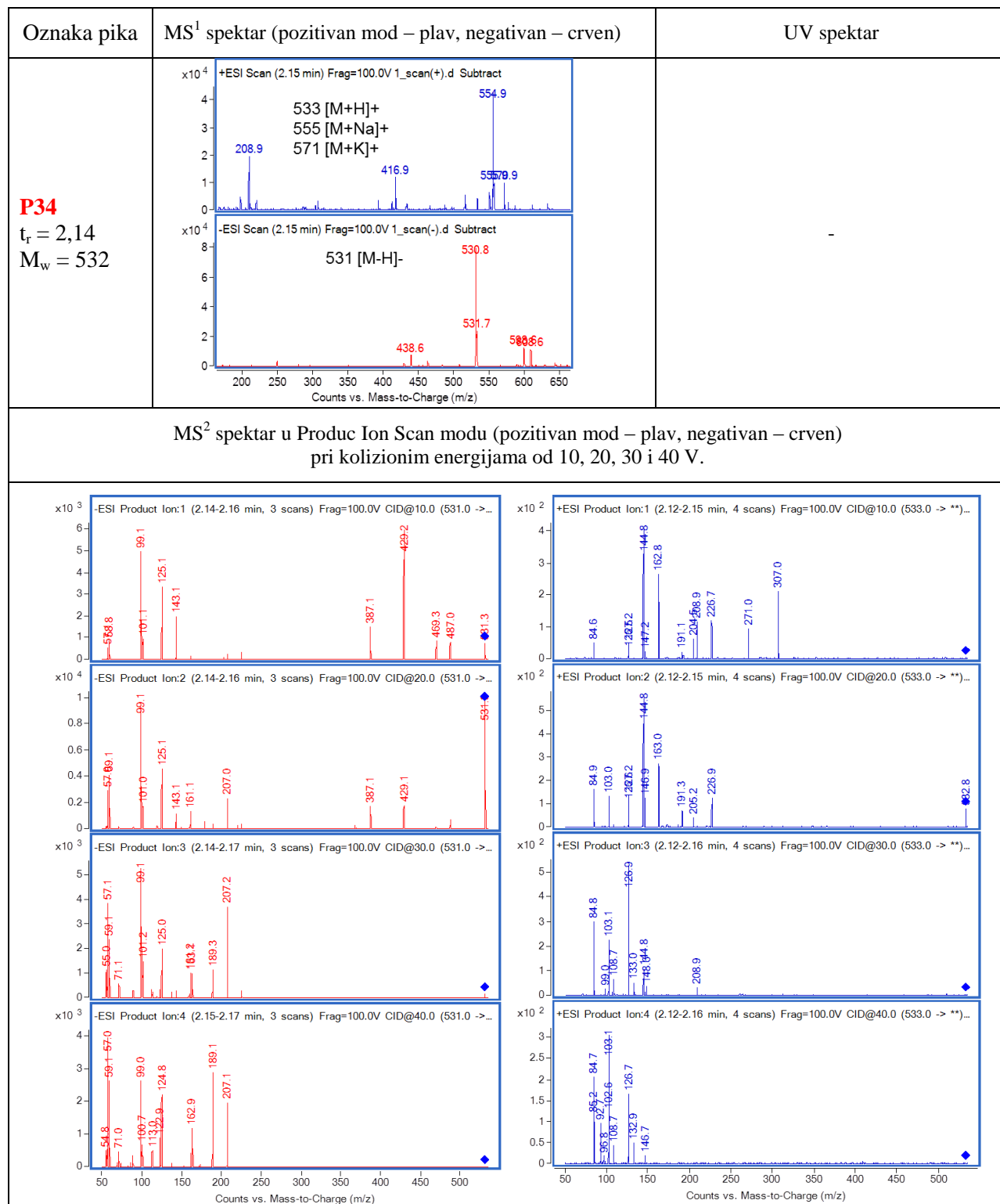


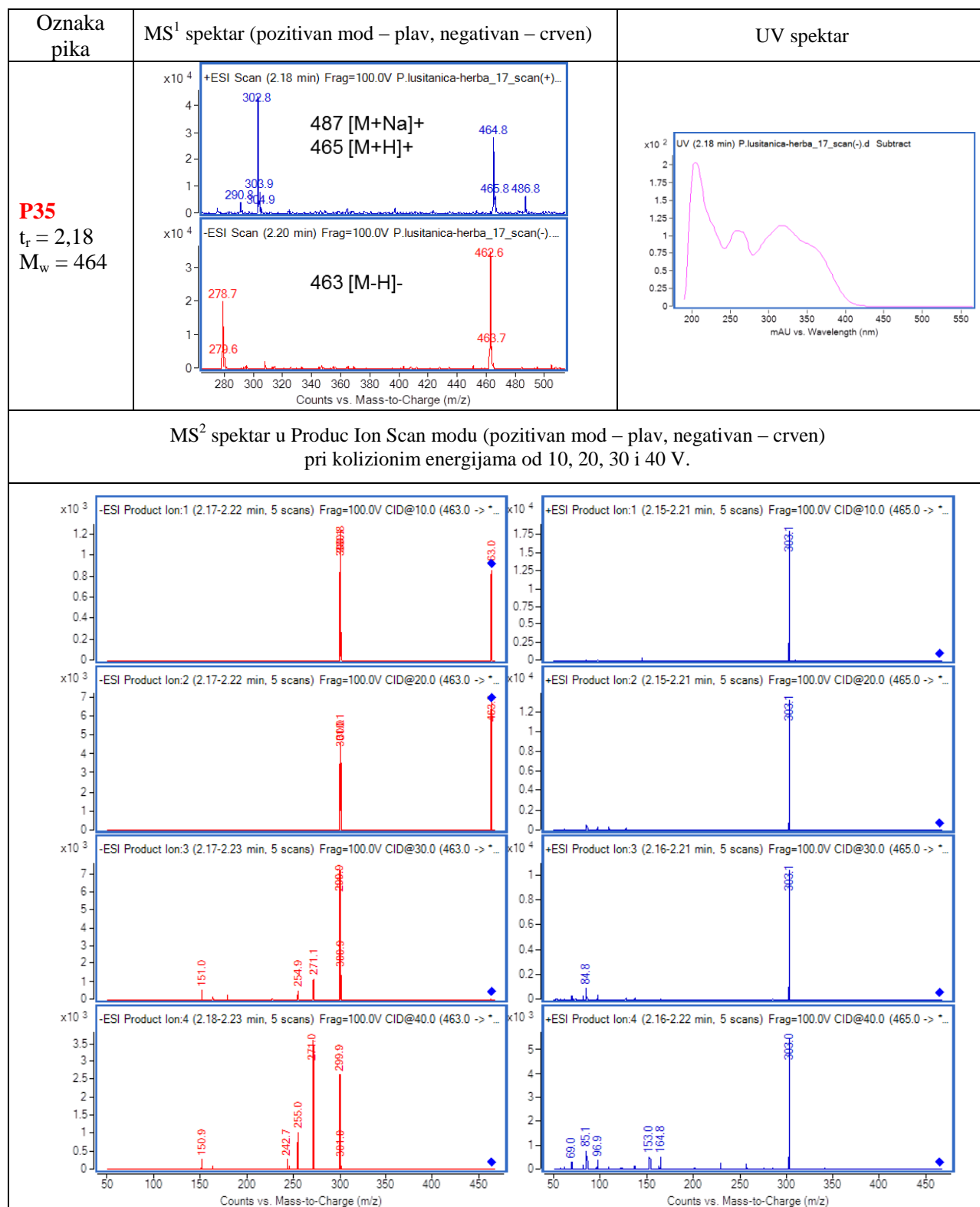


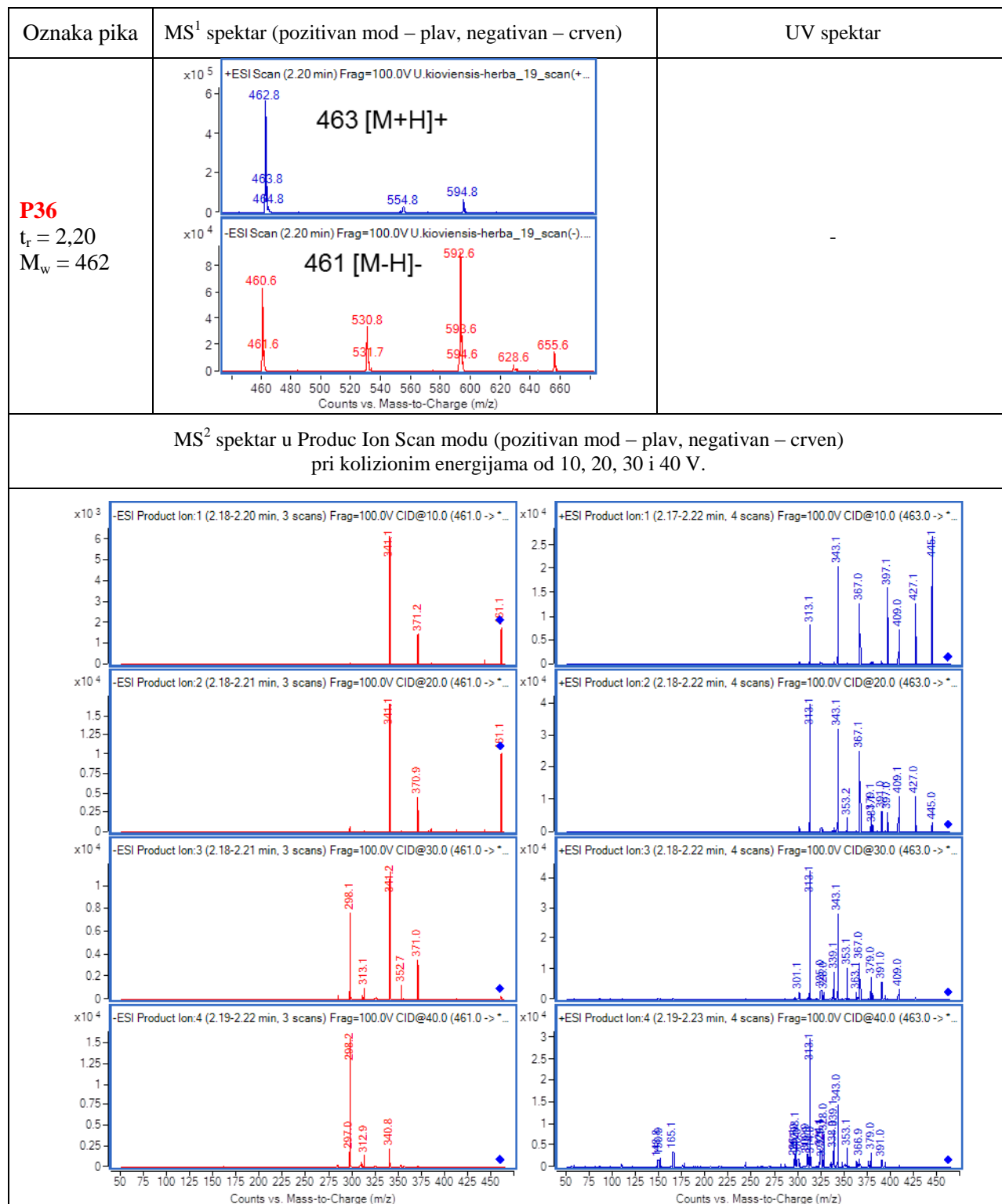


Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P32 $t_r = 2,11$ $M_w = 530$</p>	<p>-ESI Scan (2.10 min) Frag=100.0V U.kioviensis-herba_19_scan(-).d</p> <p>529 [M-H]-</p> <p>211.8 278.8 430.7 446.7 529.8 530.7 610.7 611.7</p> <p>+ESI Scan (2.11 min) Frag=100.0V U.kioviensis-herba_19_scan(+...)</p> <p>553 [M+Na]+</p> <p>207.0 208.0 252.9 289.1 432.8 448.8 433.8 518.9 519.9 553.8 552.9 568.9 634.8 635.8</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	-
<p>MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.</p>		
-		

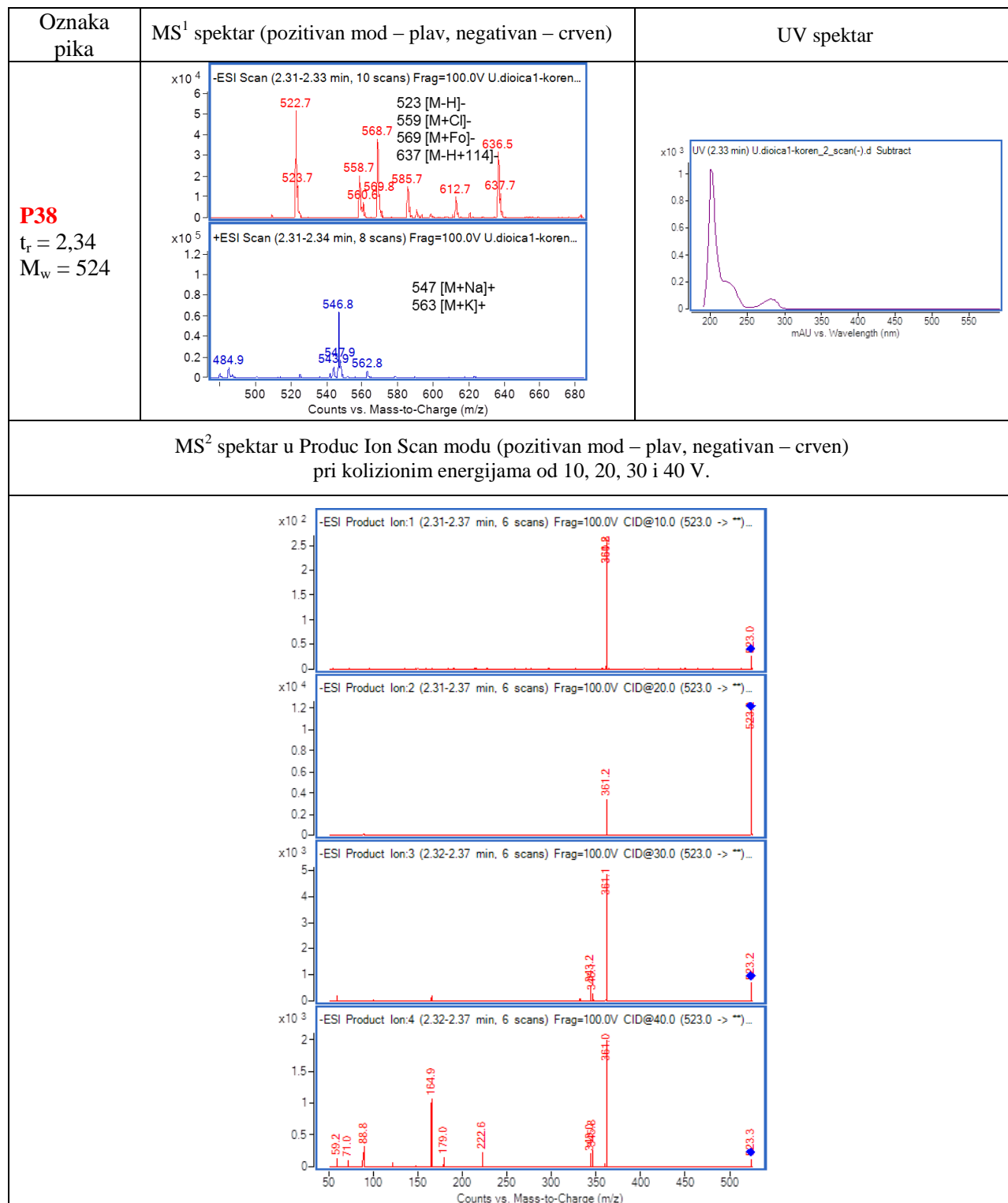


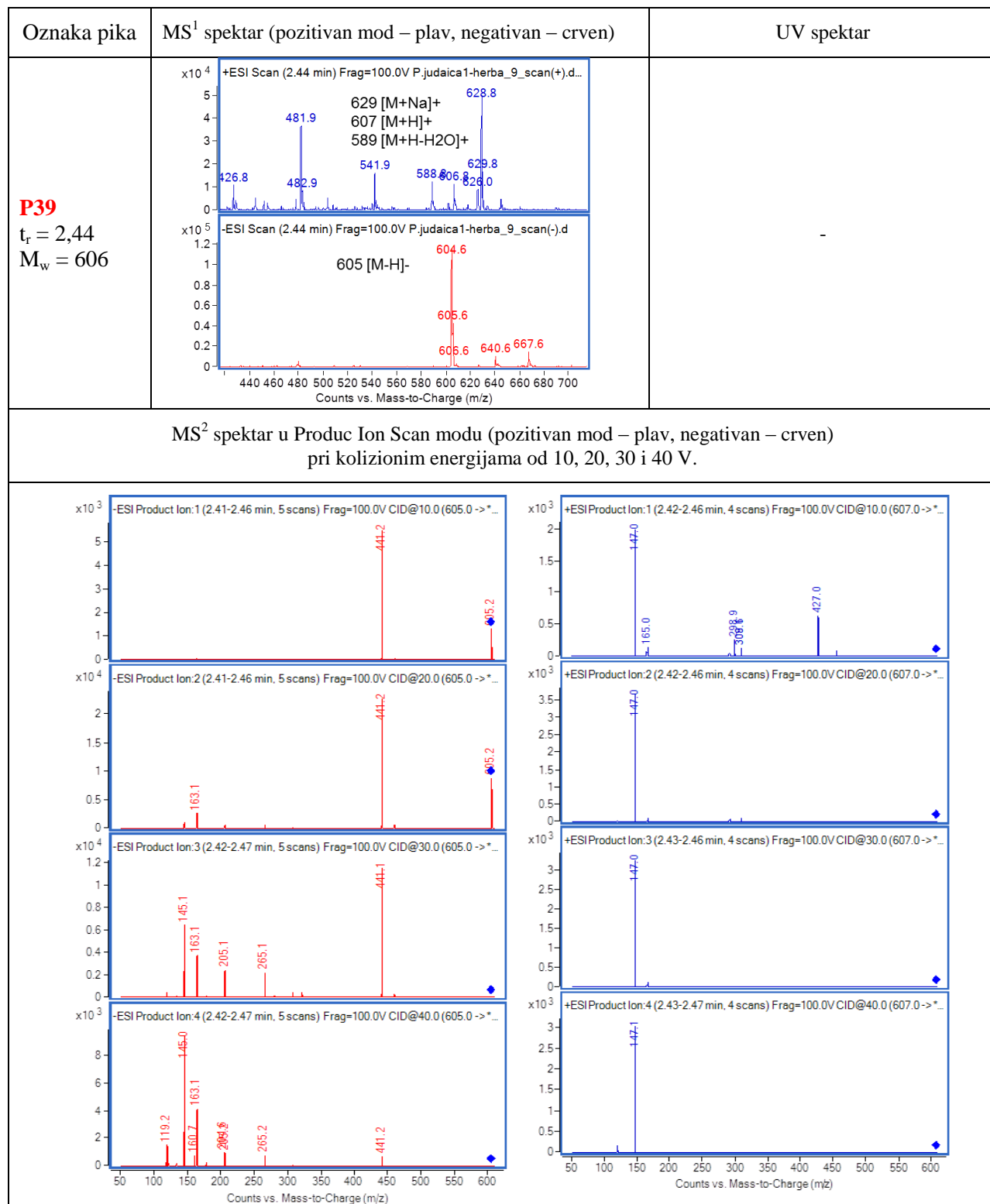


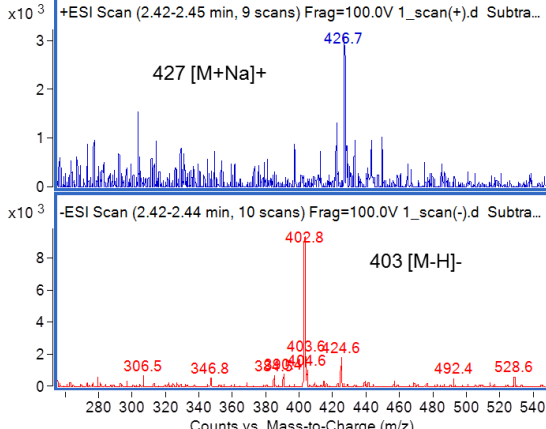
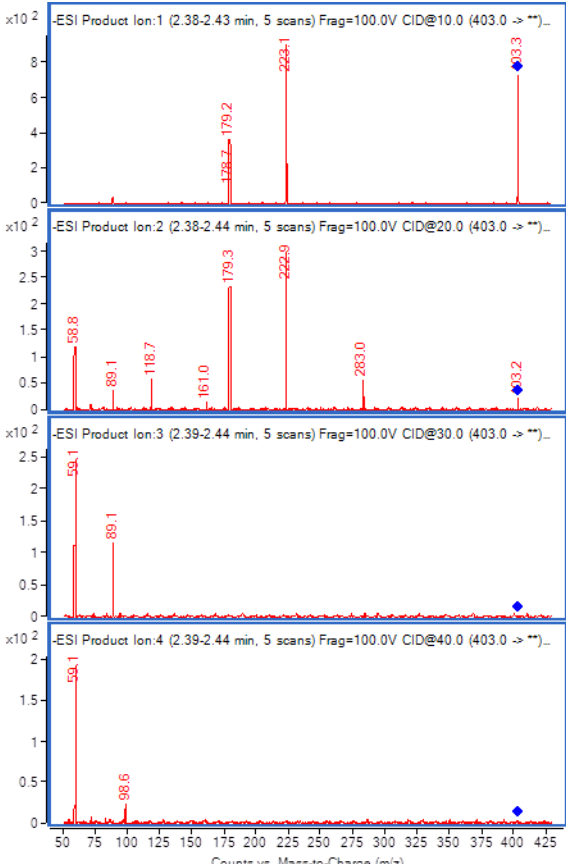


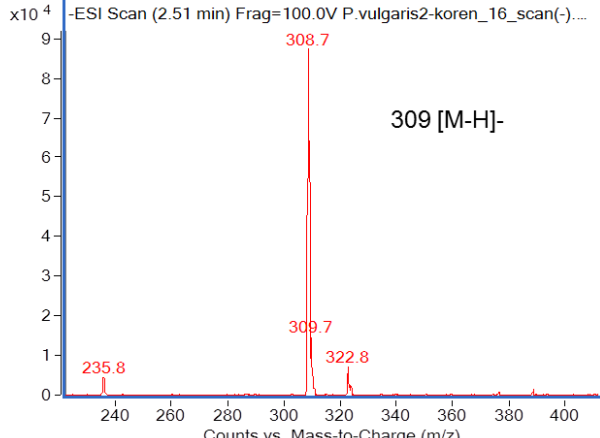
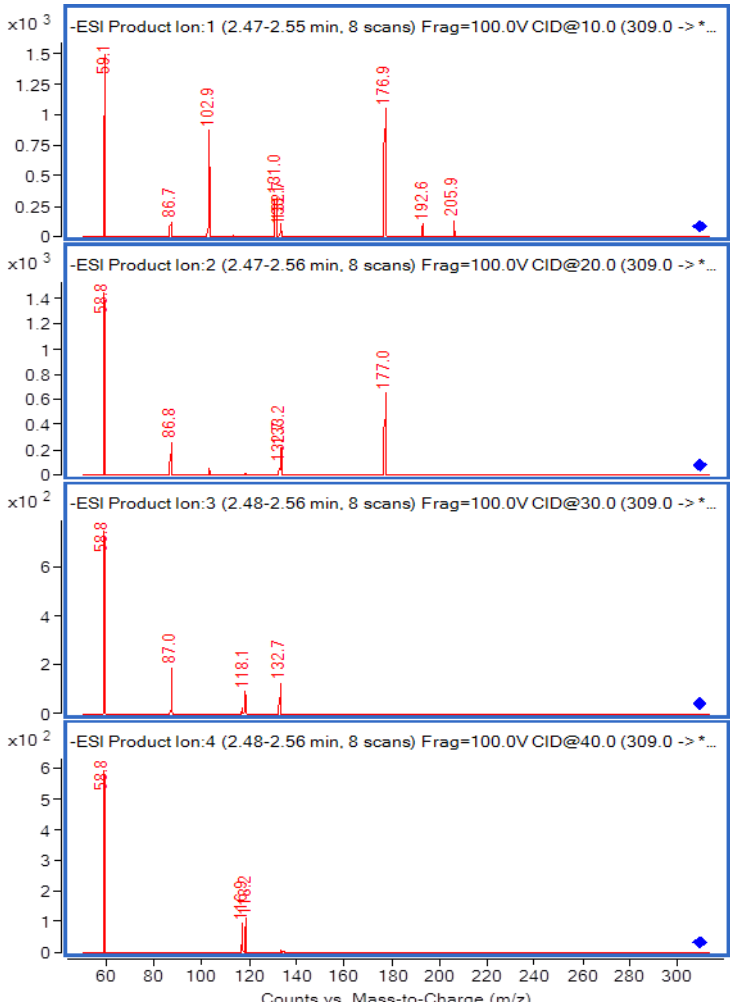


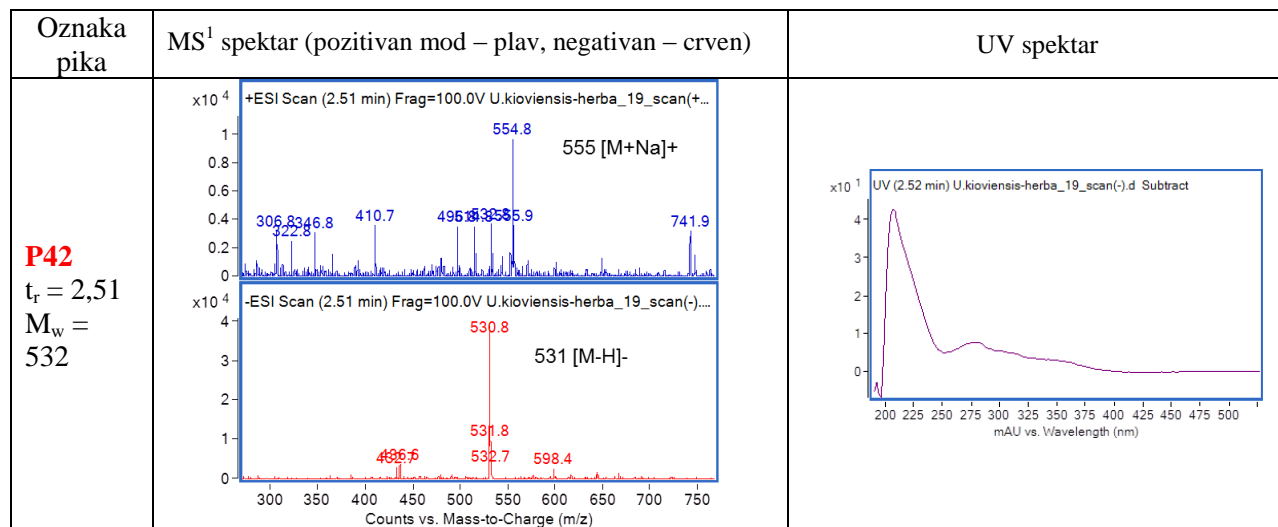
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P37 $t_r = 2,31$ $M_w = 262$</p>		-
MS ² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		



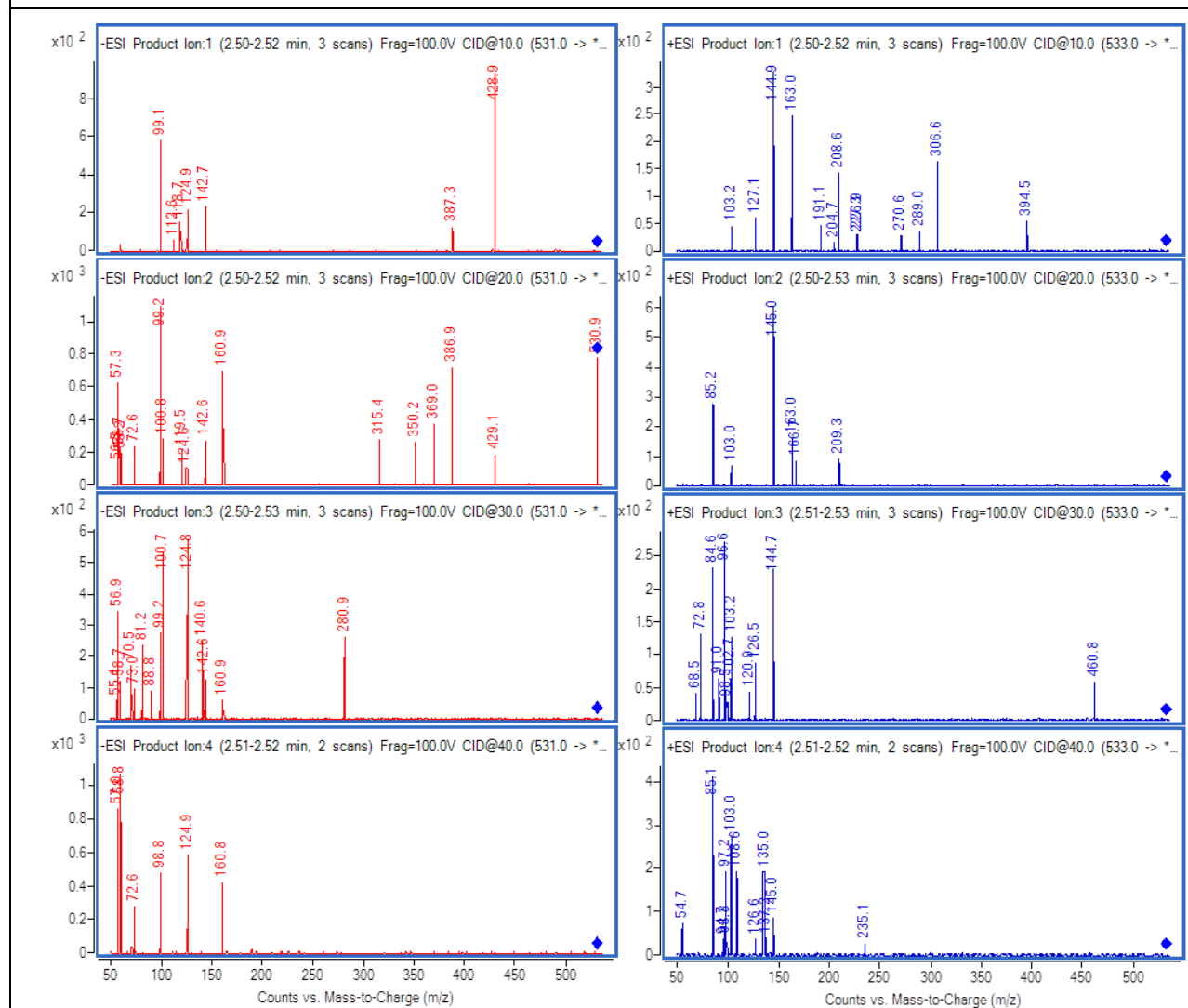


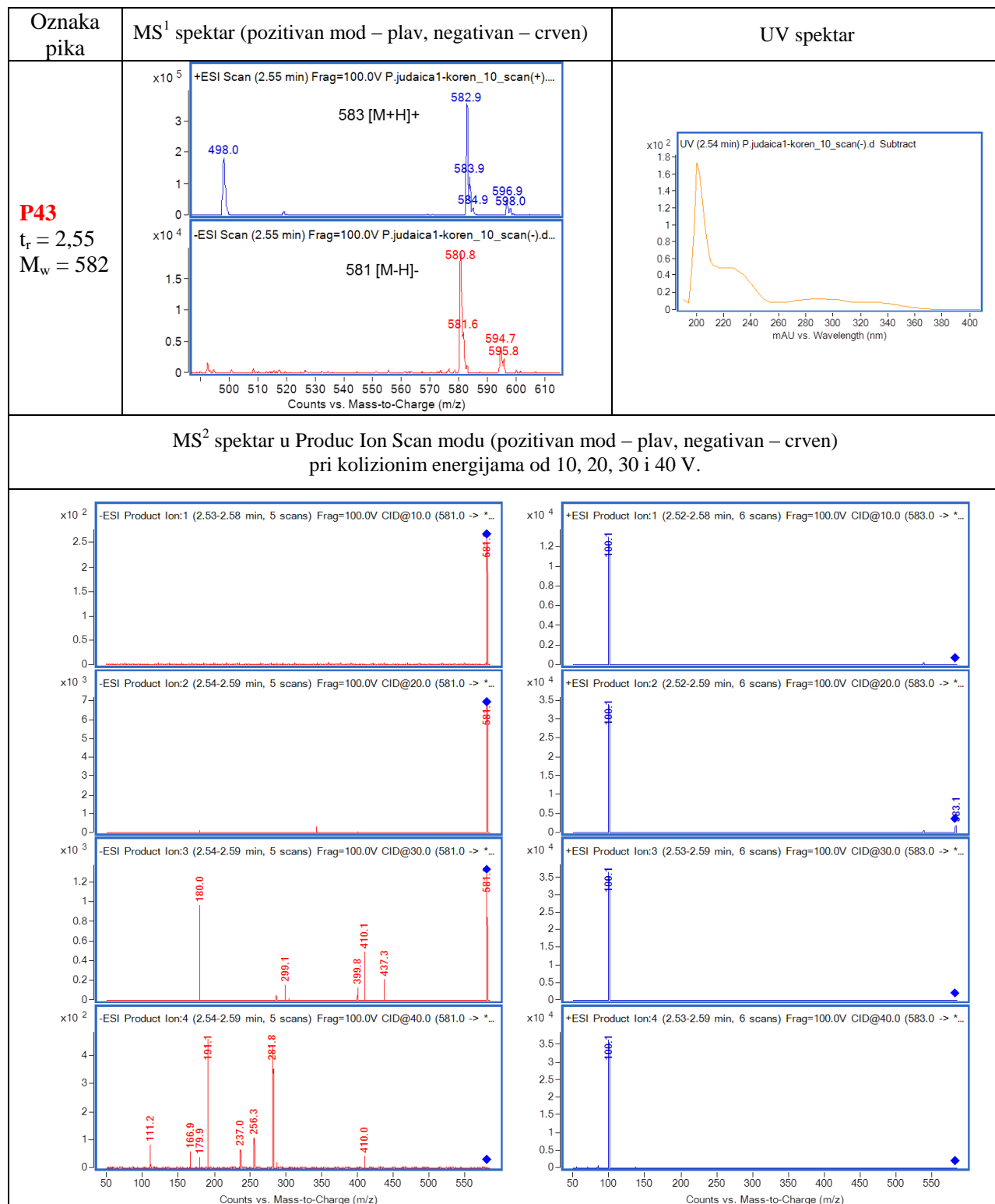
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P40 $t_r = 2,44$ $M_w = 270$</p>		-
MS ² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		
		

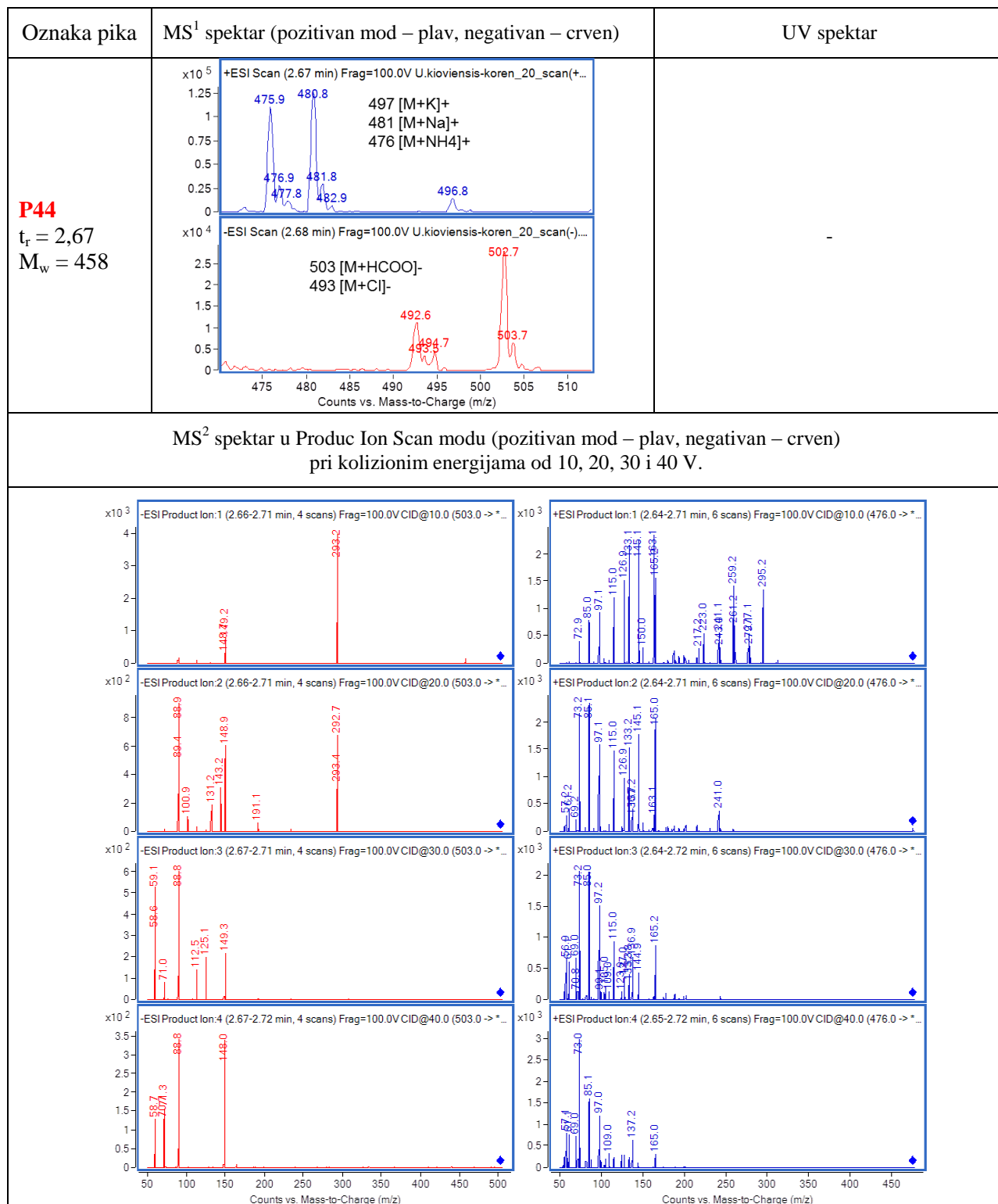
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P41 $t_r = 2,49$ $M_w = 310$</p>		-
MS ² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		
		

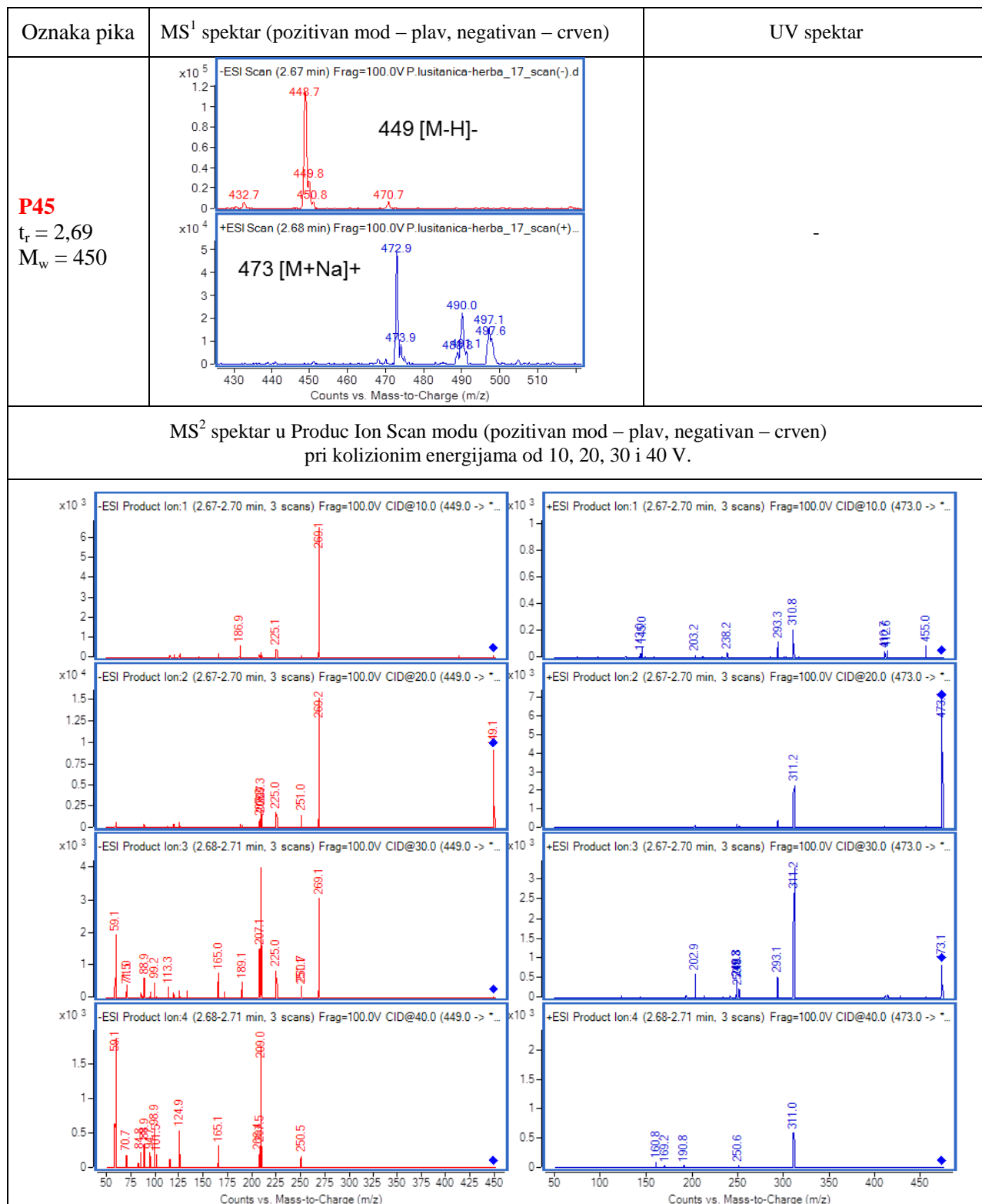


MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven)
pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.

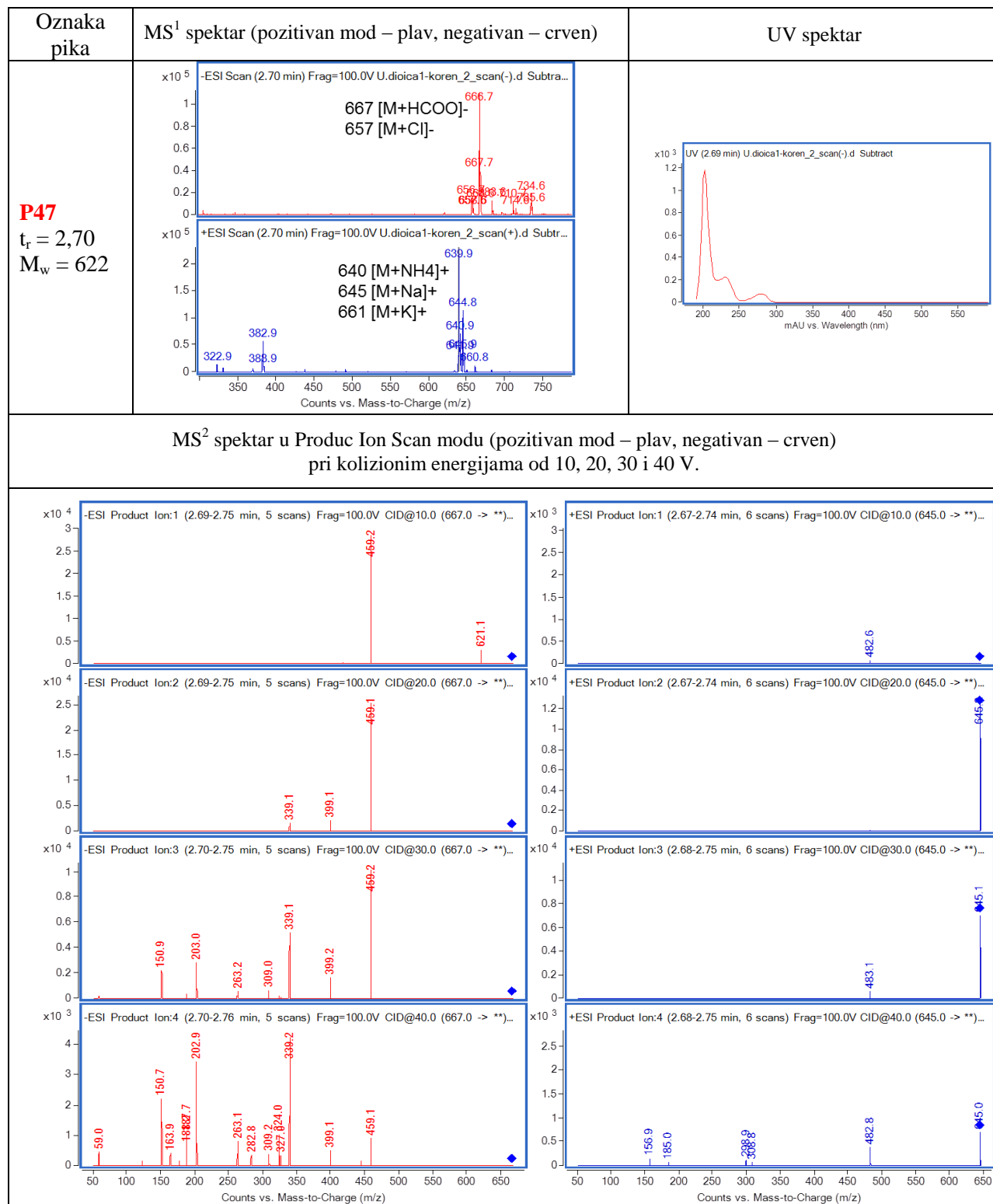






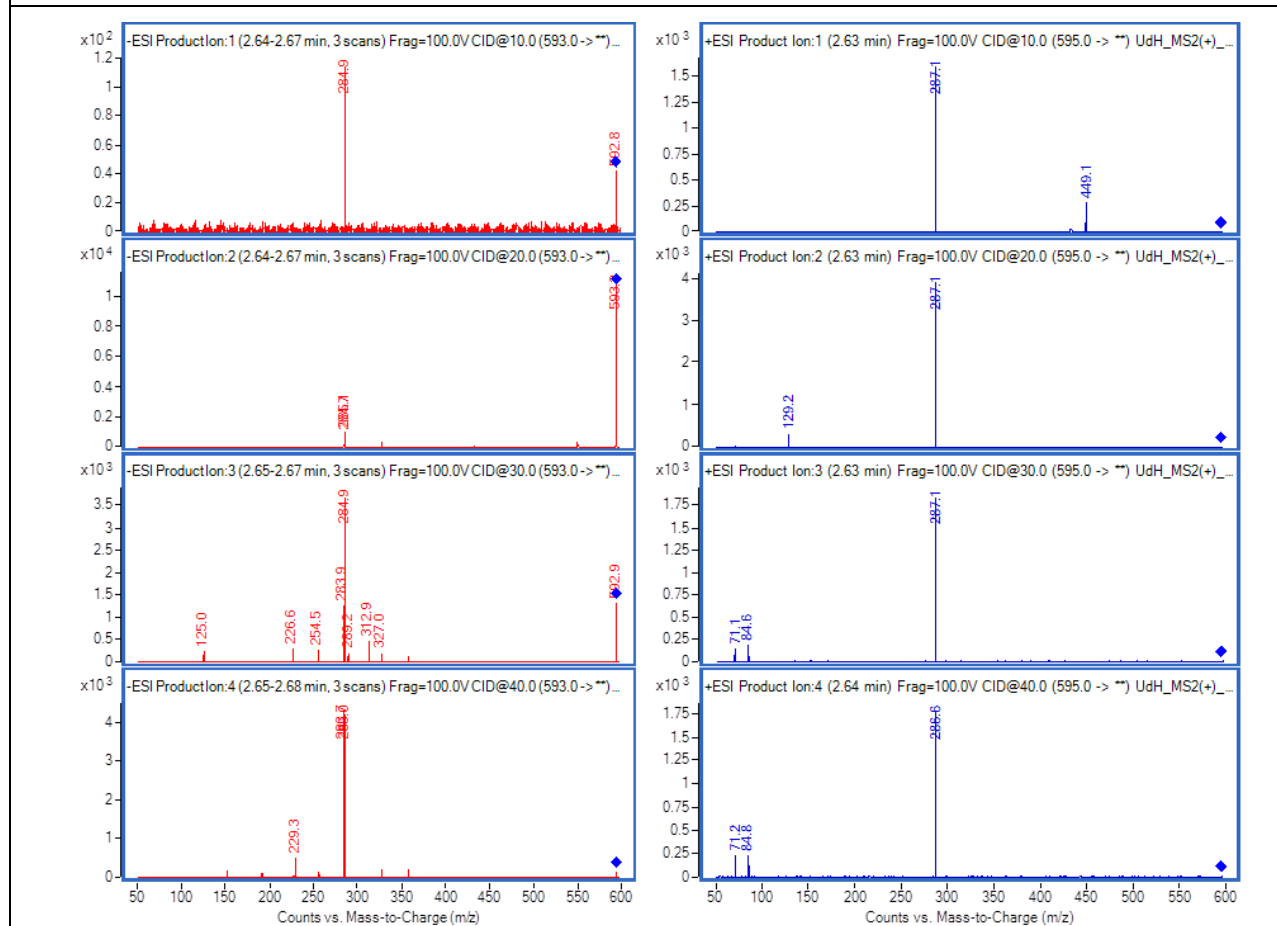


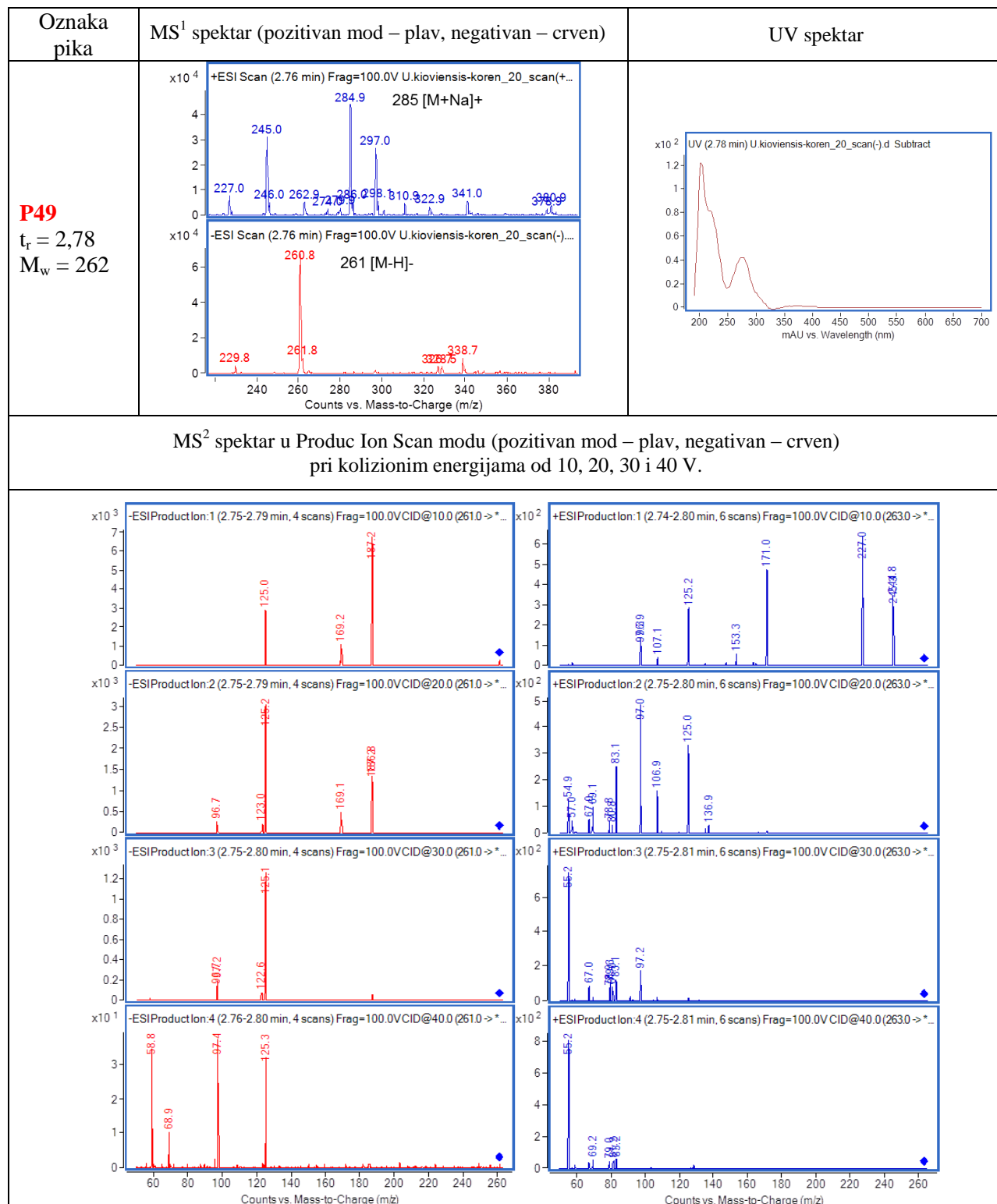
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P46 $t_r = 2,69$ $M_w = 530$</p>	<p>+ESI Scan (2.69 min) Frag=100.0V U.kioviensis-herba_19_scan(+ ...</p> <p>472.9, 553 [M+Na]+, 552.8, 554.9, 478.9, 448.8, 467.8, 474.9, 488.8, 498.0, 508.0, 518.0, 528.0, 538.0, 548.0, 558.0, 568.0, 578.0, 588.0, 594.7</p> <p>-ESI Scan (2.70 min) Frag=100.0V U.kioviensis-herba_19_scan(-).d</p> <p>448.7, 529 [M-H]-, 449.8, 450.8, 528.6, 530.7</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	<p>UV (2.70 min) U.kioviensis-herba_19_scan(-).d Subtract</p> <p>mAU vs. Wavelength (nm)</p>
<p>MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.</p>		
<p>-</p>		

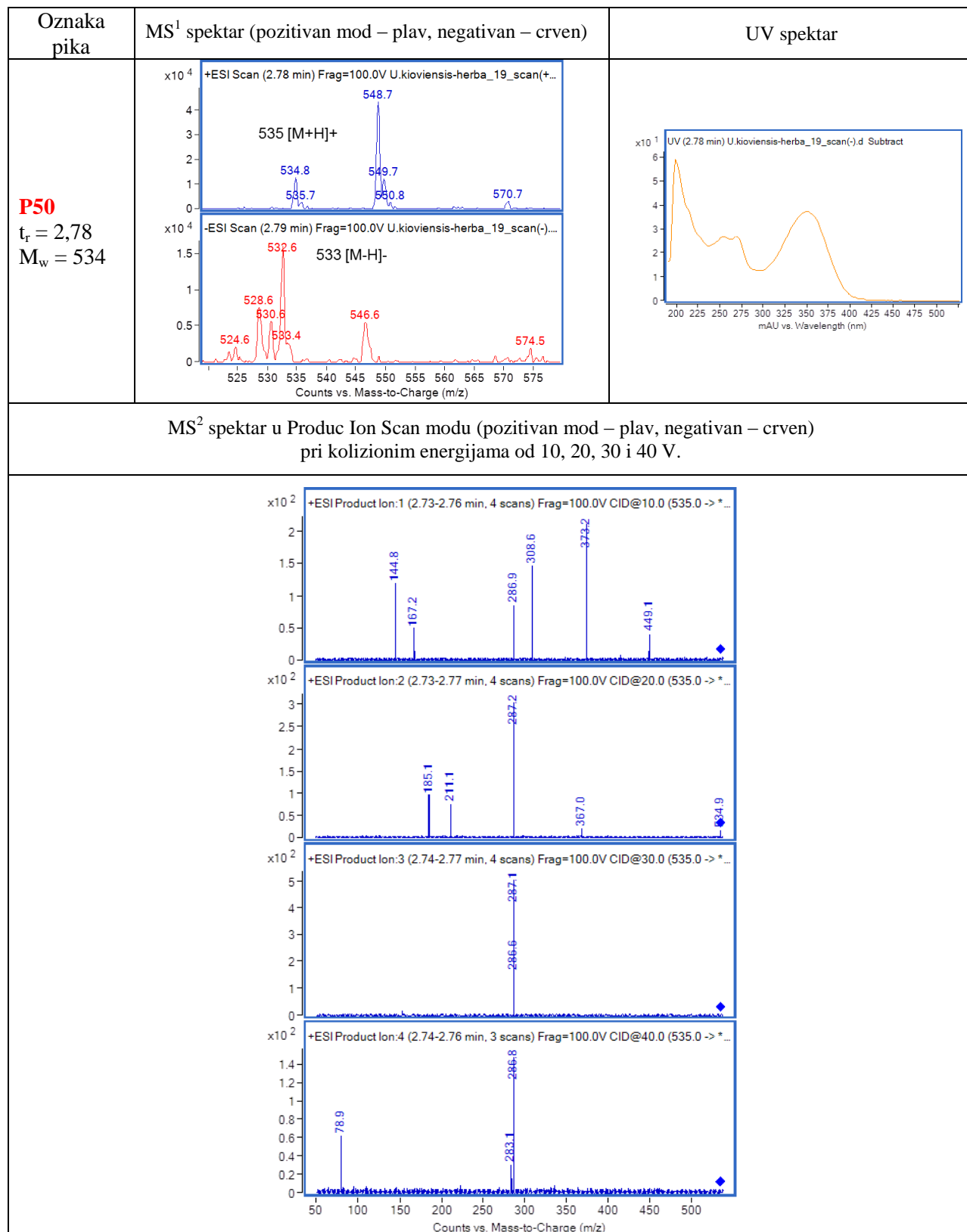


Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P48 $t_r = 2,71$ $M_w = 594$</p>		-

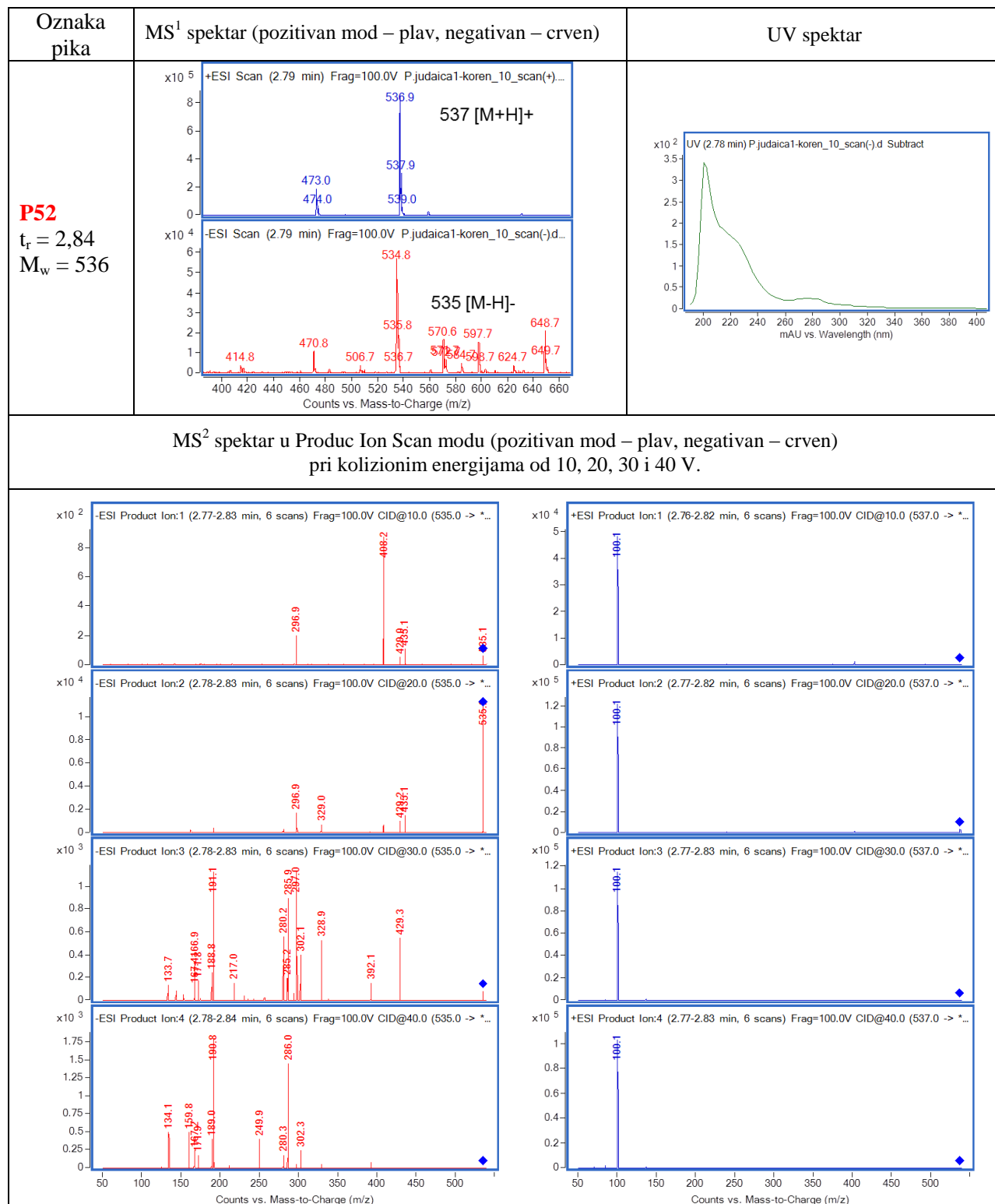
MS² spektar u Product Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven)
 pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.

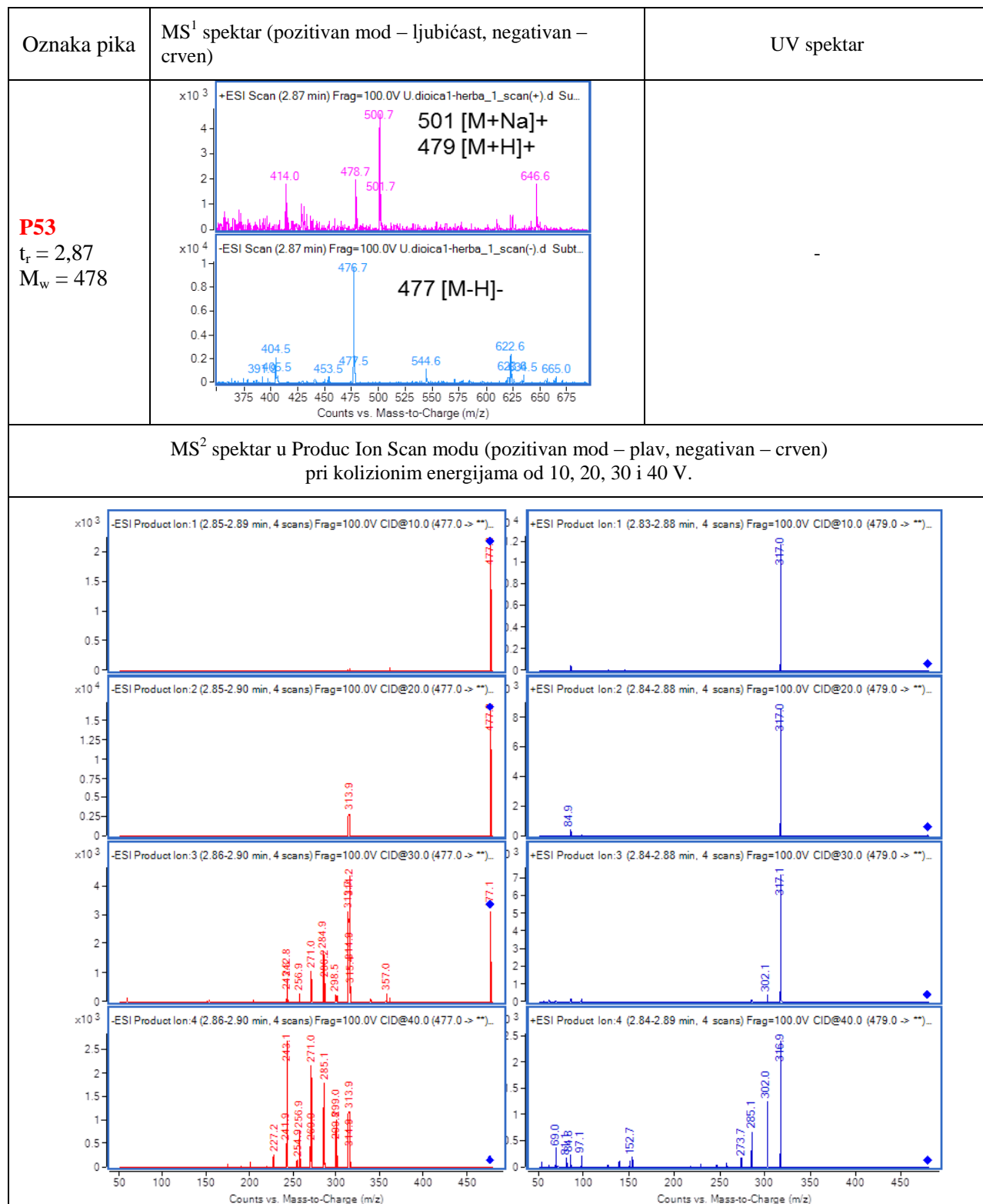


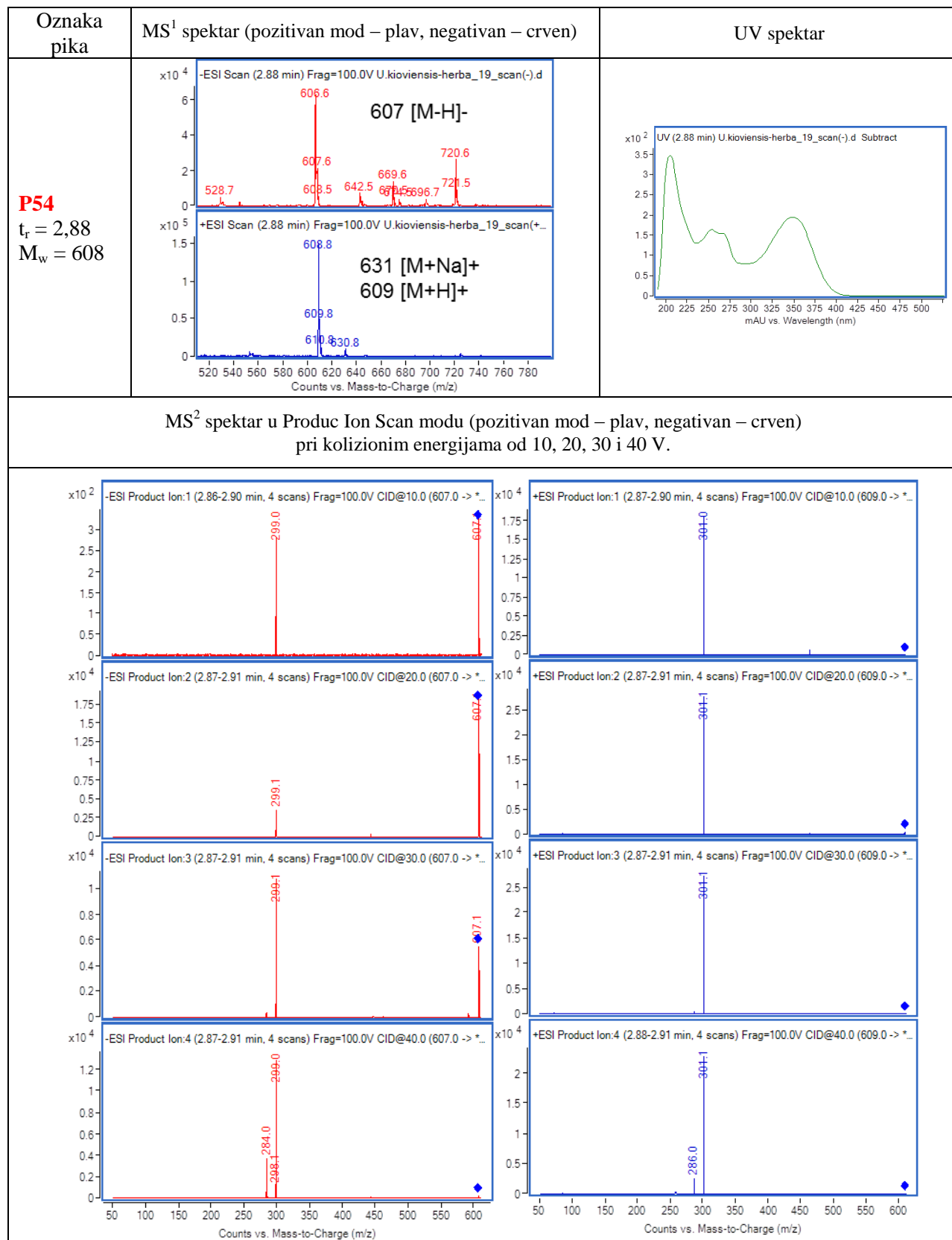


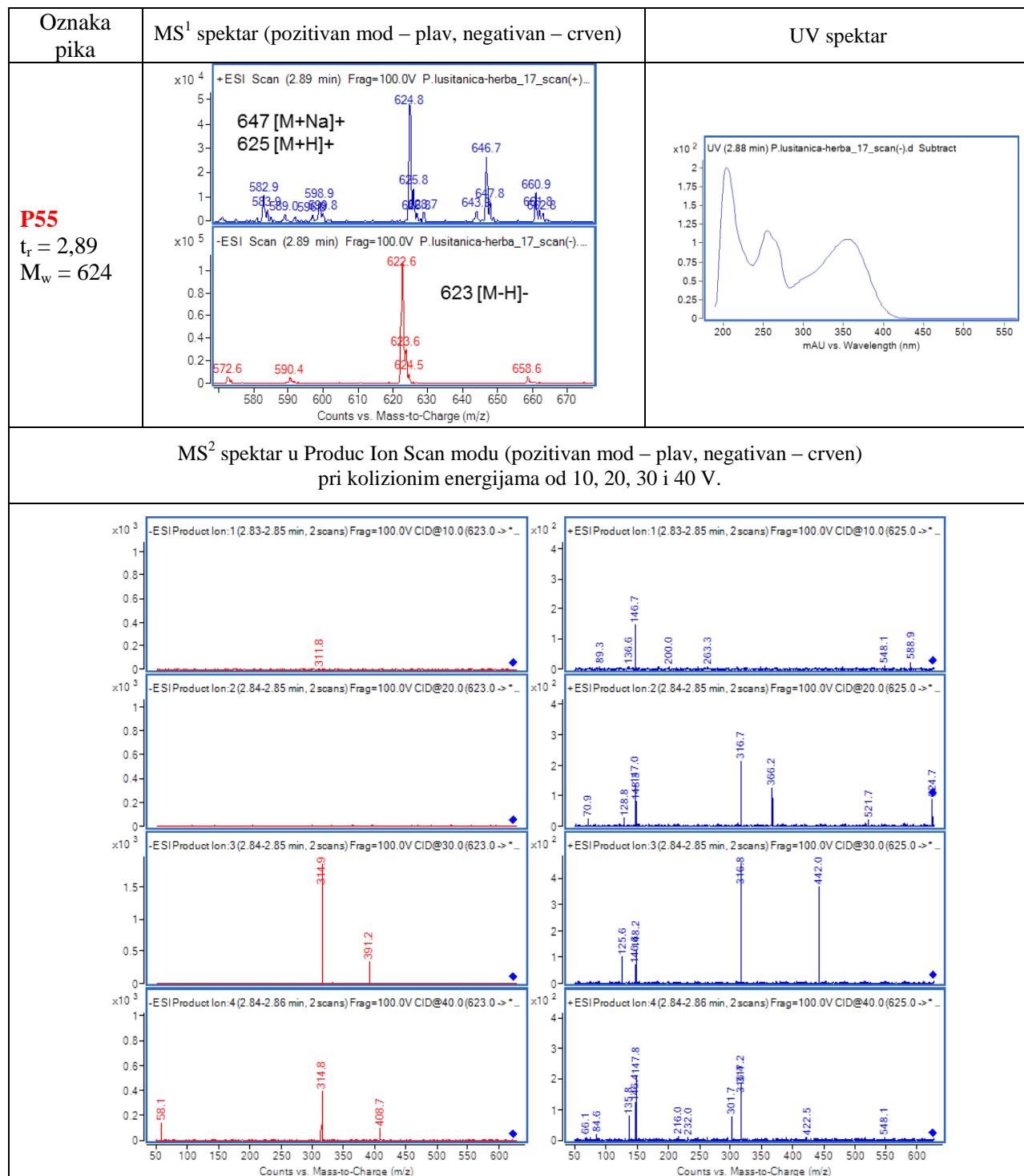


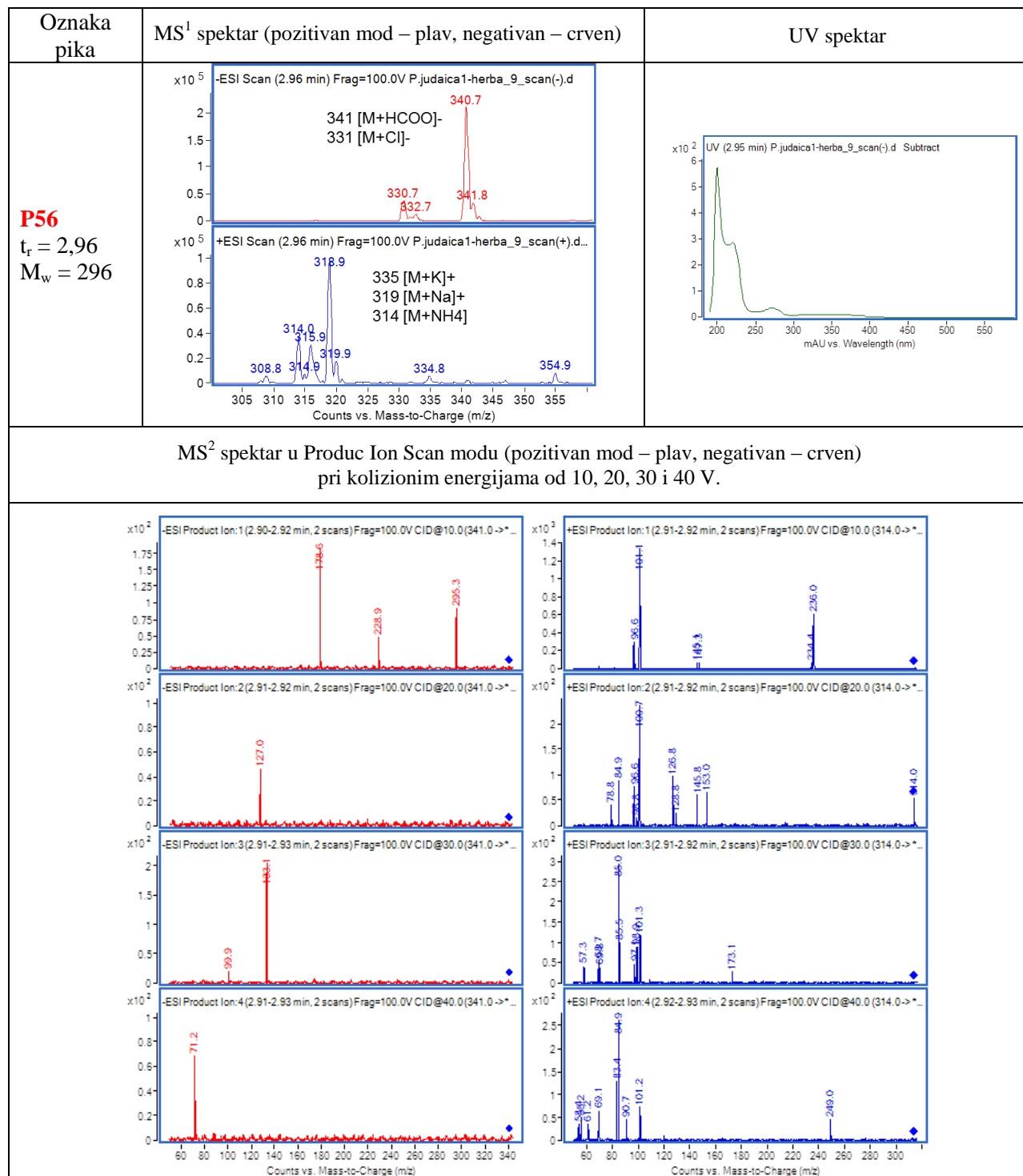
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P51 $t_r = 2,78$ $M_w = 548$</p>	<p>+ESI Scan (2.78 min) Frag=100.0V U.kioviensis-herba_19_scan(+... 571 [M+Na]⁺ 549 [M+H]⁺</p> <p>-ESI Scan (2.79 min) Frag=100.0V U.kioviensis-herba_19_scan(-)... 547 [M-H]⁻</p>	-
<p>MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.</p>		
-		

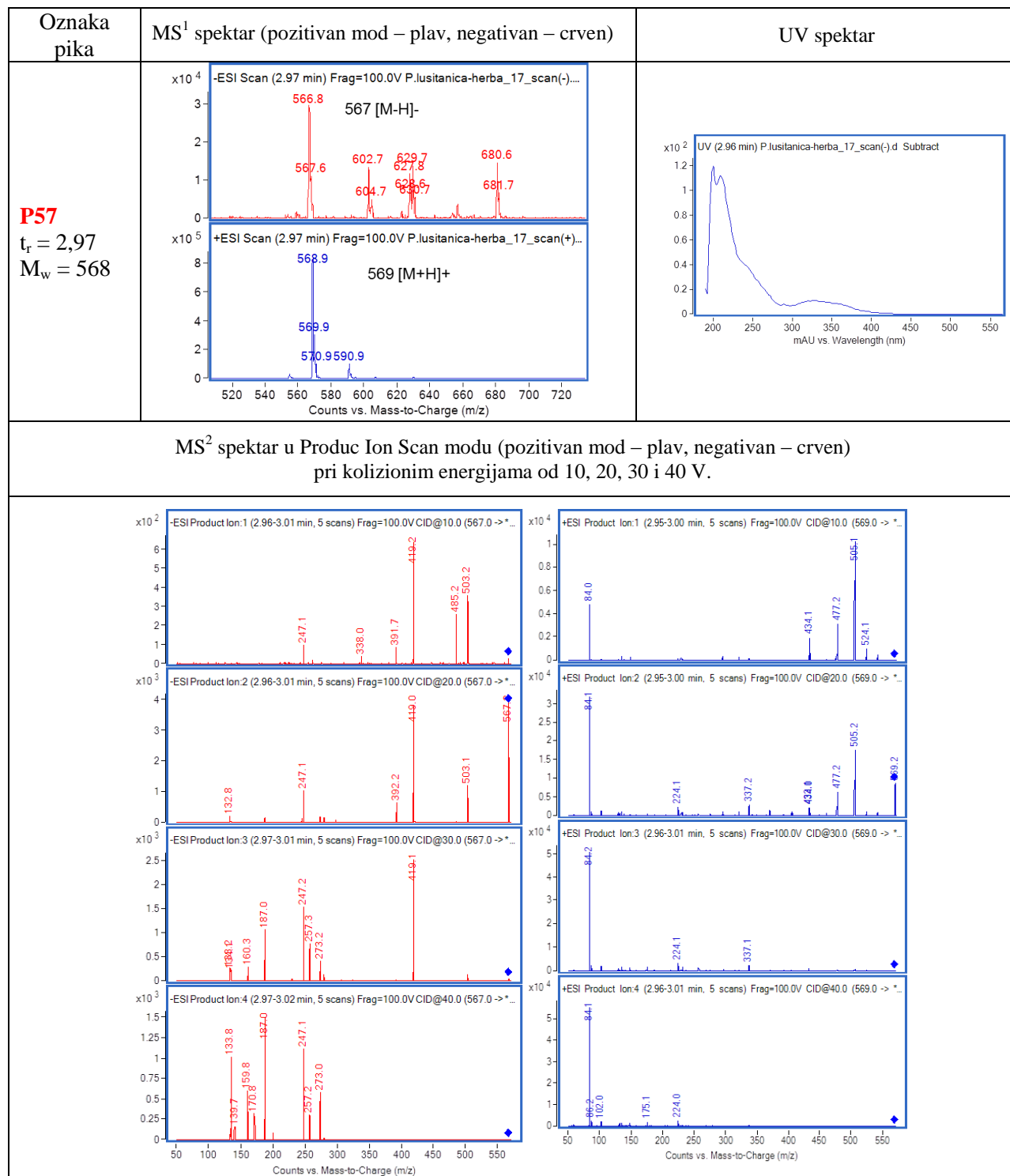






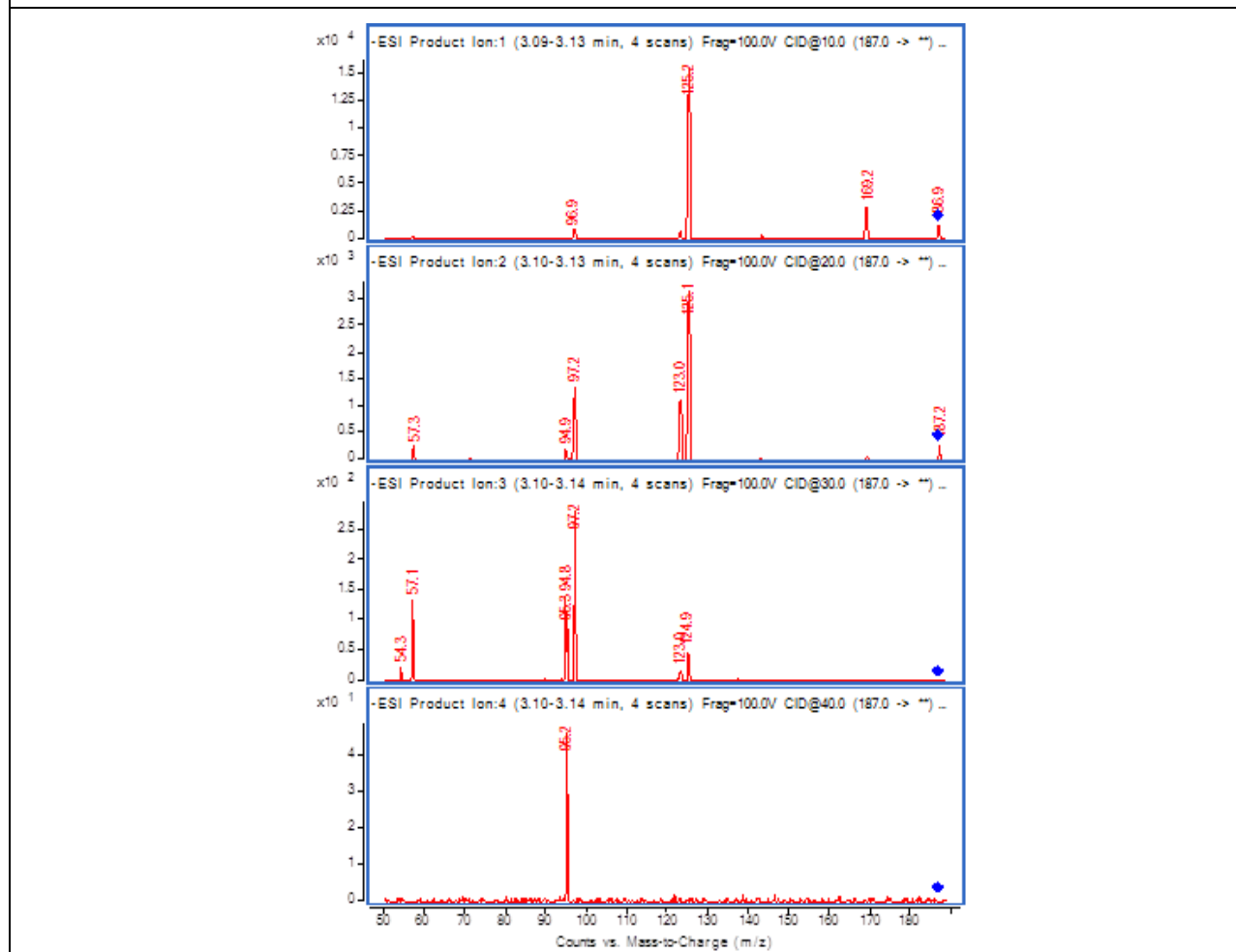


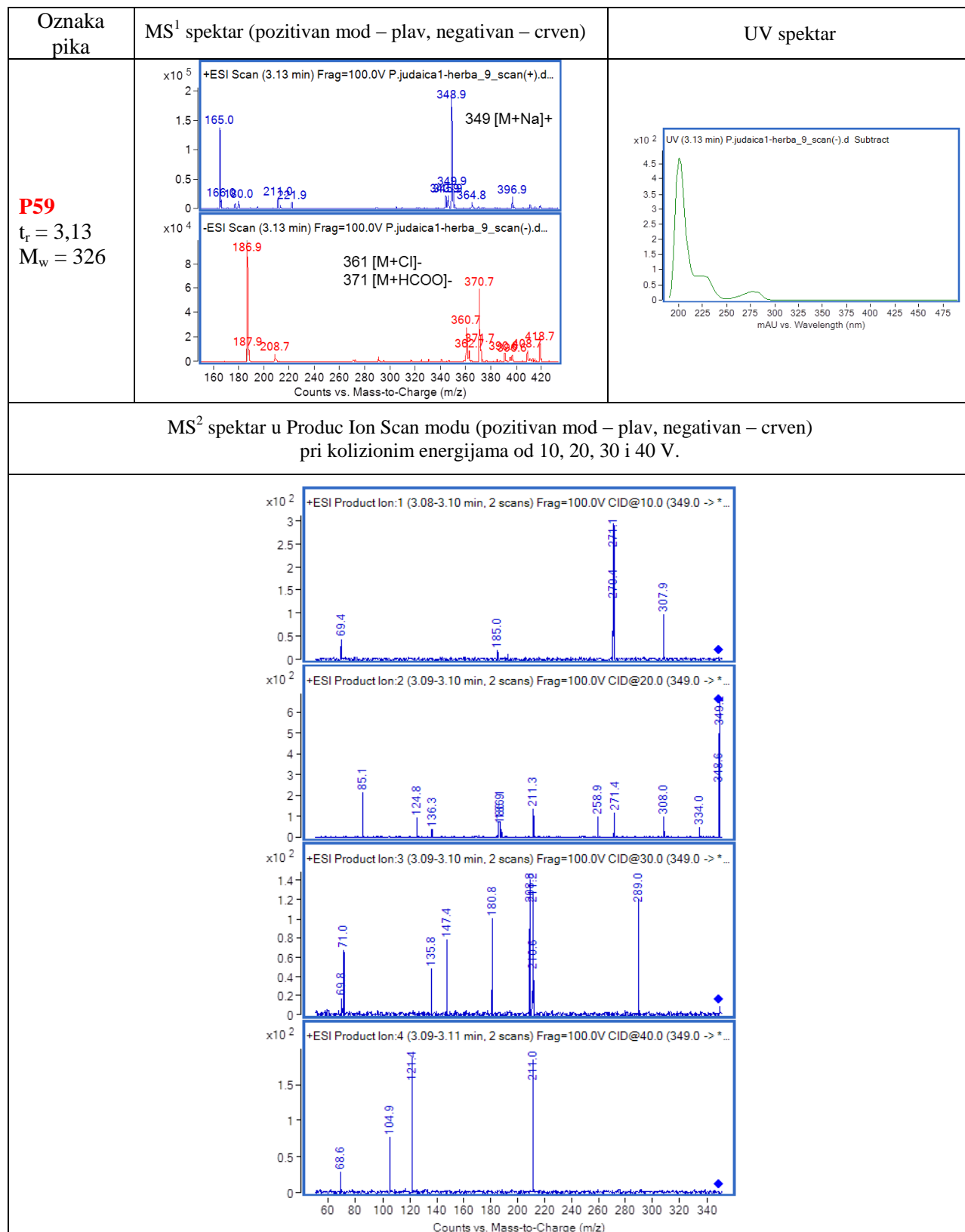




Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P58 $t_r = 3,12$ $M_w = 188$		-

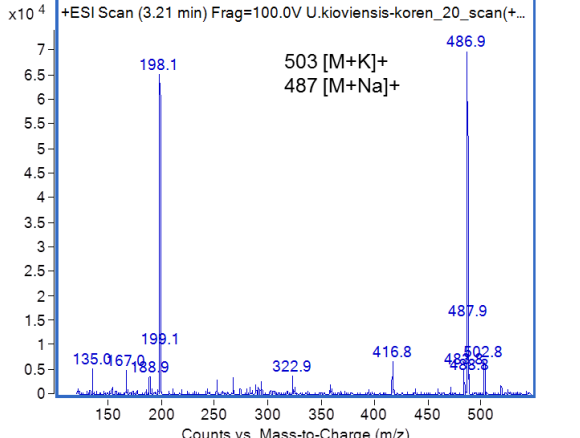
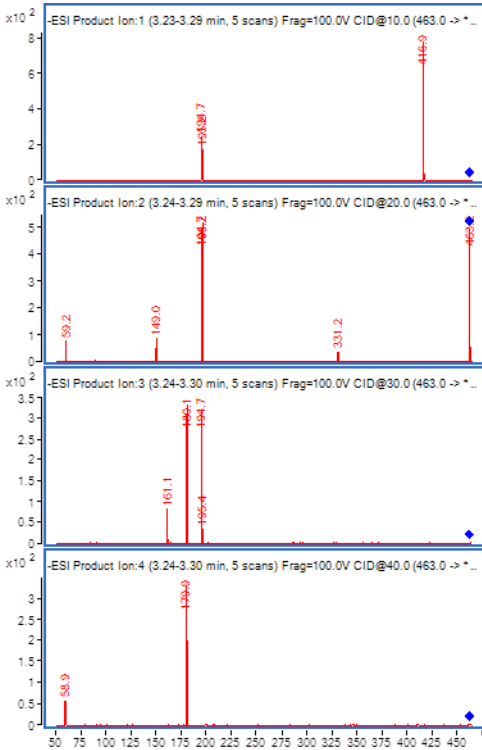
MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.

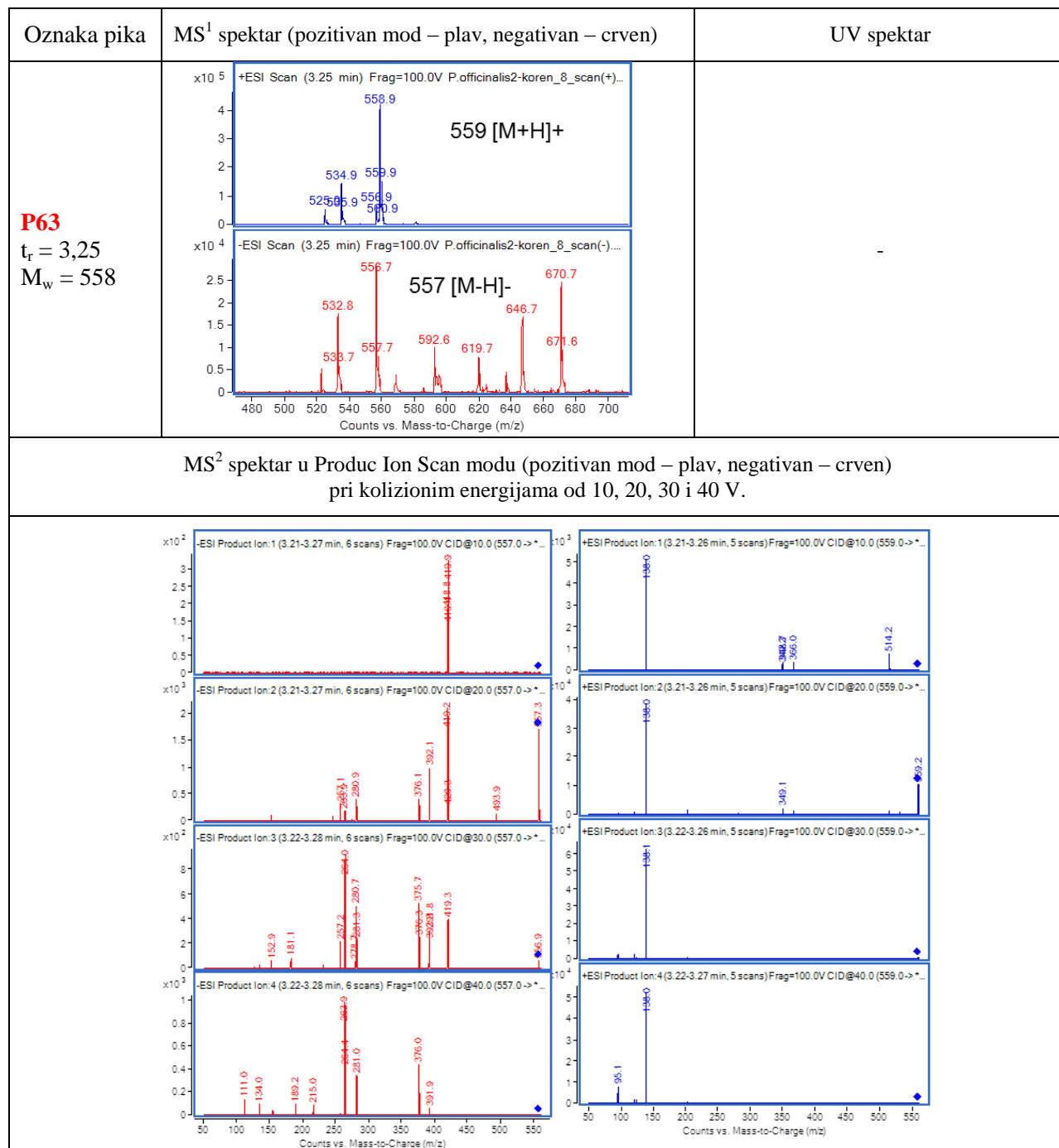


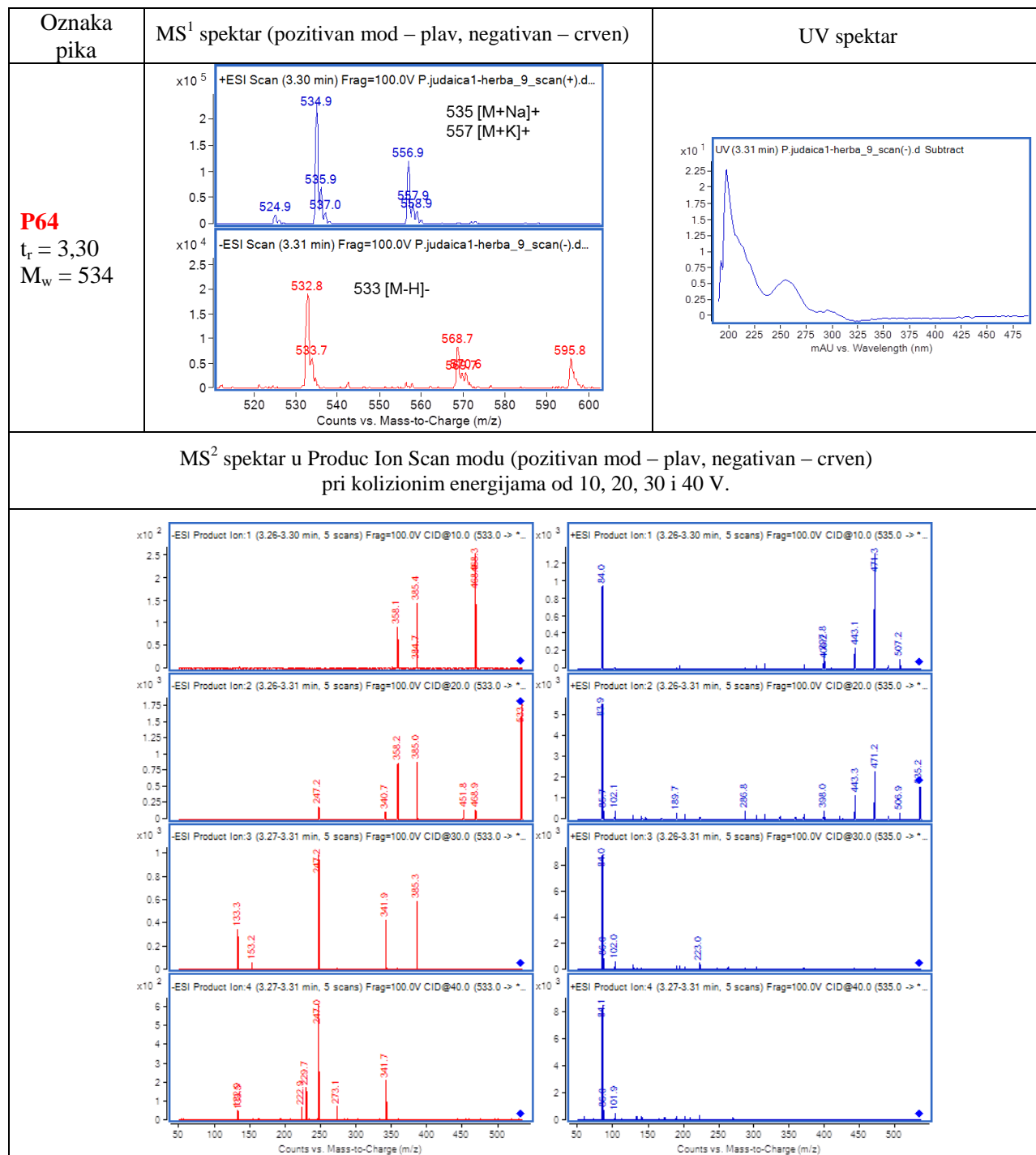


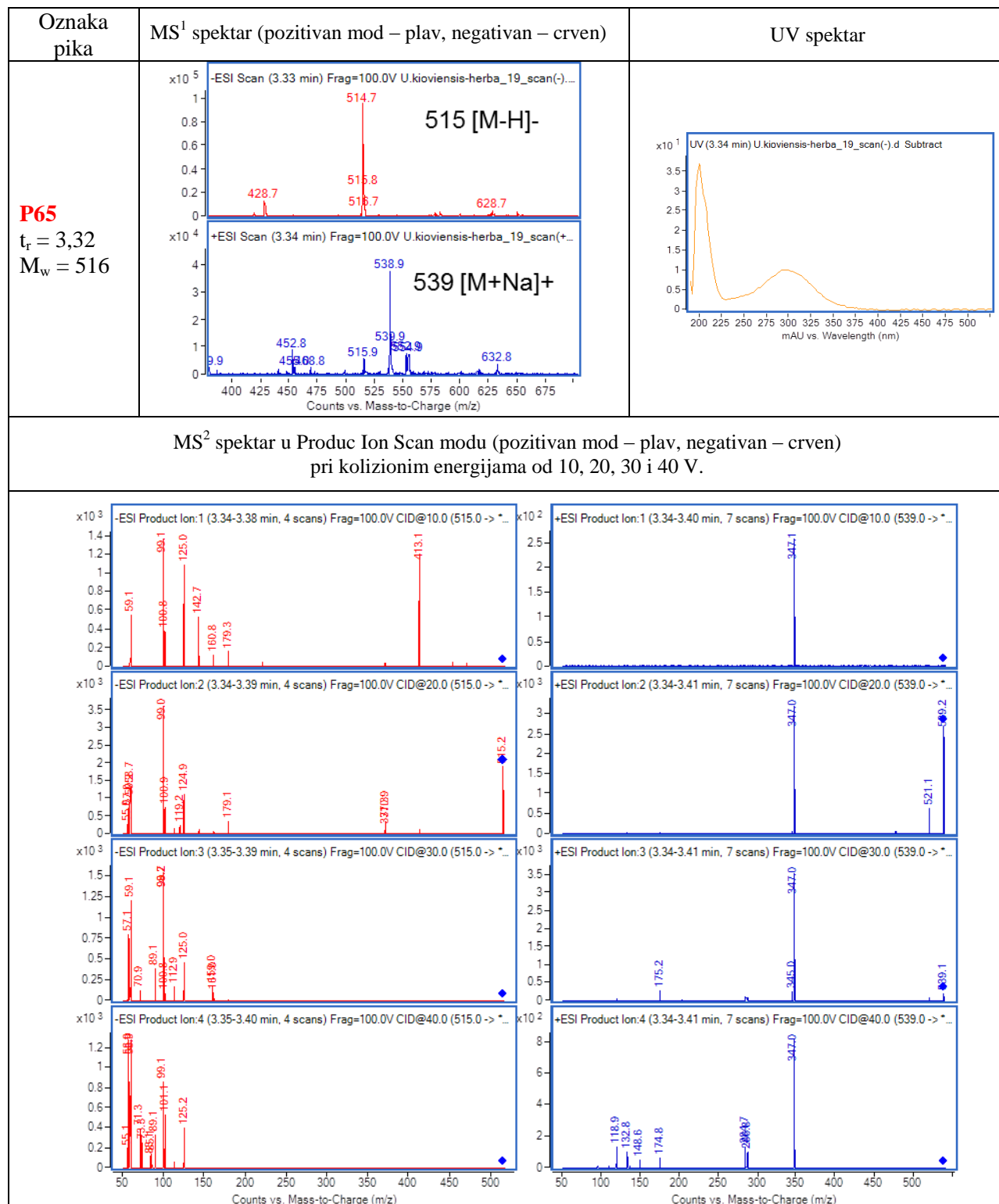
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P60 $t_r = 3,18$ $M_w = 526$	<p>+ESI Scan (3.18 min) Frag=100.0V P.officialis2-herba_7_scan(+)... Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p> <p>512.9, 513.8, 526.9, 527.9, 528.9, 548.8, 549 [M+Na]+, 527 [M+H]+, 571.0</p>	-
MS ² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		
-		

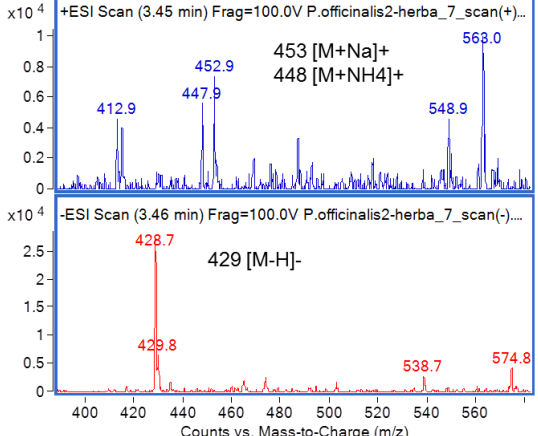
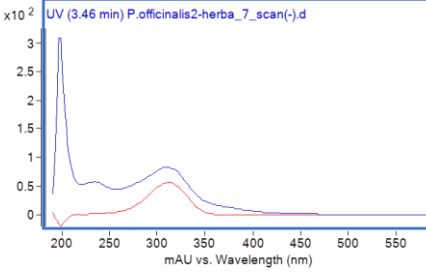
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P61 $t_r = 3,25$ $M_w = 558$</p>		-
MS ² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		
<p>MS² spectra showing relative intensity versus mass-to-charge ratio (m/z) for positive (left column) and negative (right column) ions at collision energies of 20 V, 30 V, and 40 V. The x-axis for all plots is 'Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)' and the y-axis is relative intensity.</p> <ul style="list-style-type: none"> Positive Ion Scans (Left Column): <ul style="list-style-type: none"> 20 V: Base peak at m/z 523.0. Other peaks at 247.2, 342.2, 358.0, 365.1, 385.9, 395.1, 522.9. 30 V: Base peak at m/z 523.0. Other peaks at 222.0, 247.0, 342.0, 358.1, 385.2, 522.9. 40 V: Base peak at m/z 523.0. Other peaks at 134.3, 222.8, 246.9, 342.1, 522.9. Negative Ion Scans (Right Column): <ul style="list-style-type: none"> 20 V: Base peak at m/z 525.0. Other peaks at 315.1, 4269.3. 30 V: Base peak at m/z 525.0. Other peak at 35.2. 40 V: Base peak at m/z 525.0. Other peak at 95.1. 		

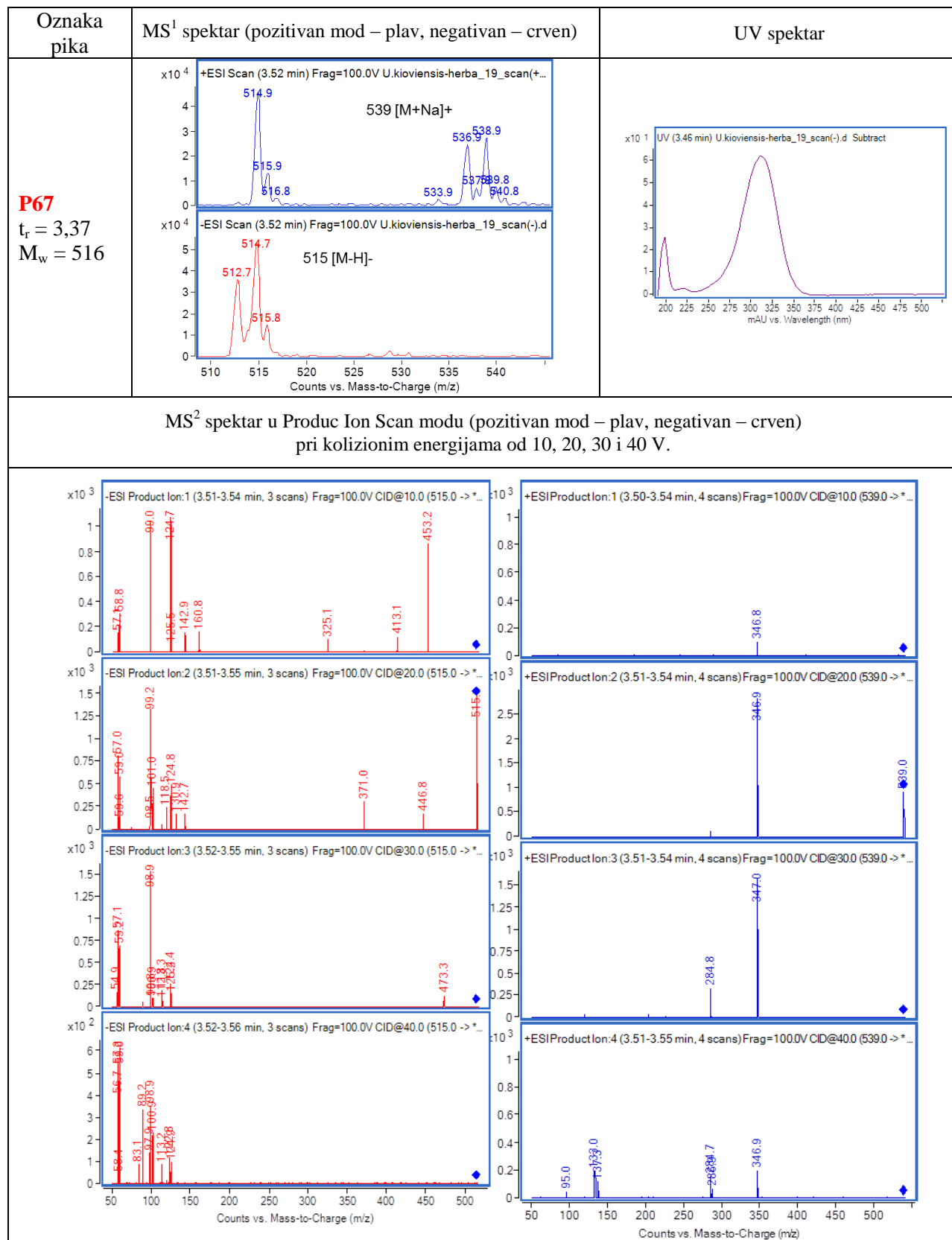
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P62 $t_r = 3,21$ $M_w = 464$</p>	 <p>+ESI Scan (3.21 min) Frag=100.0V U.kioviensis-koren_20_scan(+... 503 [M+K]⁺ 487 [M+Na]⁺</p>	-
<p>MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.</p>		
 <p>-ESI Product Ion:1 (3.23-3.29 min, 5 scans) Frag=100.0V CID@10.0 (463.0 -> *... -ESI Product Ion:2 (3.24-3.29 min, 5 scans) Frag=100.0V CID@20.0 (463.0 -> *... -ESI Product Ion:3 (3.24-3.30 min, 5 scans) Frag=100.0V CID@30.0 (463.0 -> *... -ESI Product Ion:4 (3.24-3.30 min, 5 scans) Frag=100.0V CID@40.0 (463.0 -> *... Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>		





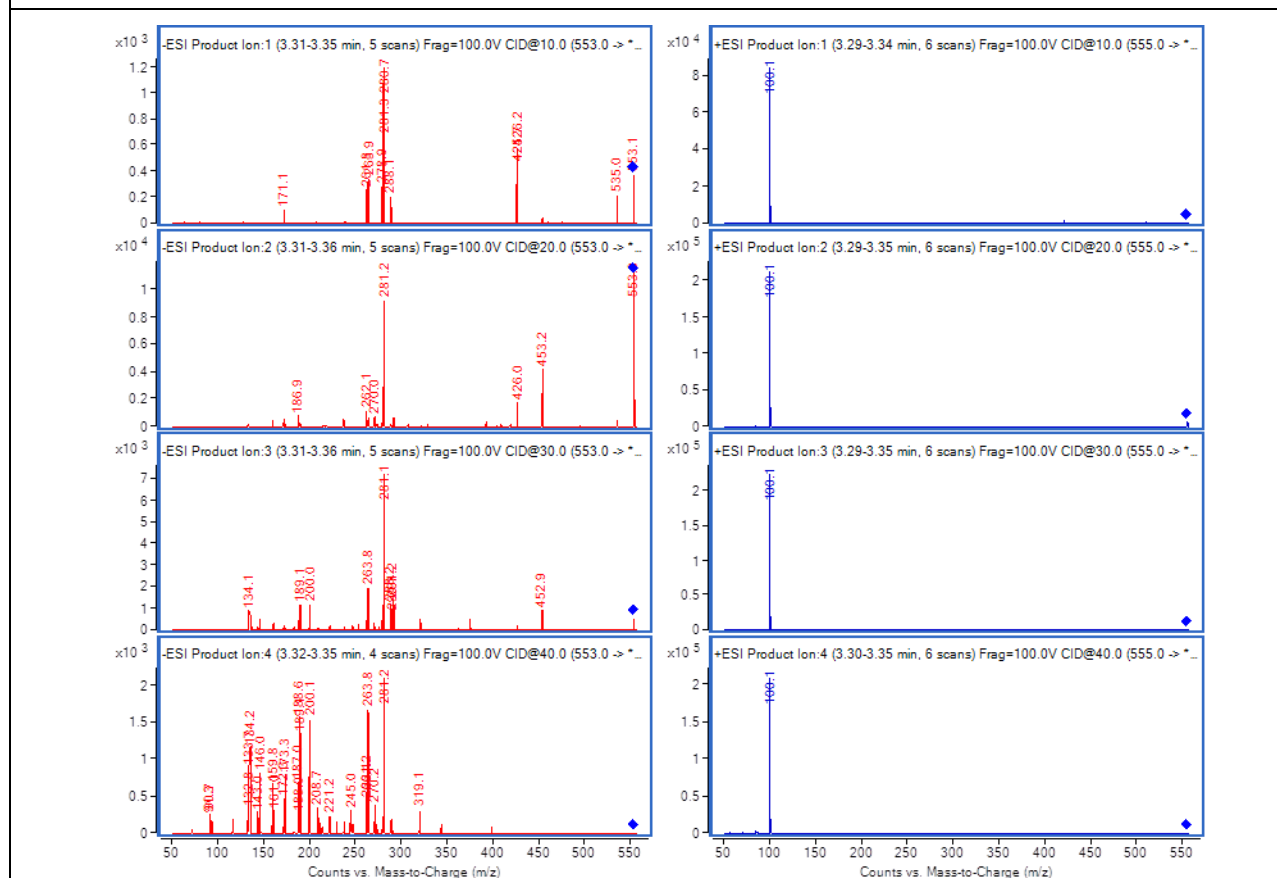


Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P66 $t_r = 3,34$ $M_w = 430$</p>	 <p>+ESI Scan (3.45 min) Frag=100.0V P.officinalis2-herba_7_scan(+)... 412.9 447.9 452.9 448 [M+NH4]+ 453 [M+Na]+ 548.9 563.0</p> <p>-ESI Scan (3.46 min) Frag=100.0V P.officinalis2-herba_7_scan(-)... 428.7 429 [M-H]- 429.8 538.7 574.8</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	 <p>UV (3.46 min) P.officinalis2-herba_7_scan(-).d</p> <p>mAU vs. Wavelength (nm)</p>
<p>MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.</p>		
<p>-</p>		



Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P68 $t_r = 3,42$ $M_w = 554$		-

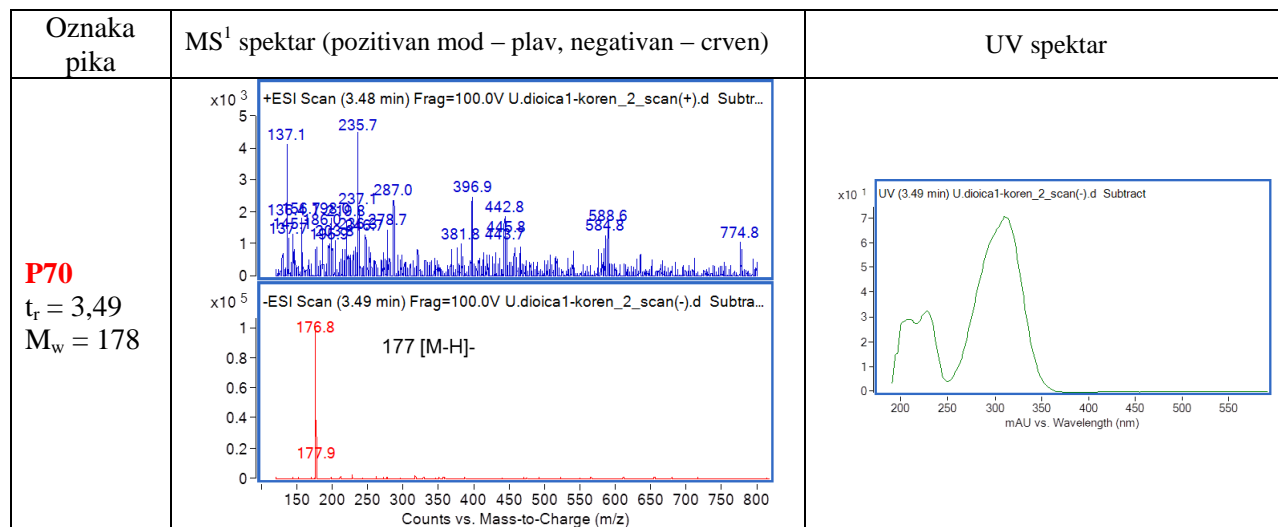
MS² spektar u Product Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven)
pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.



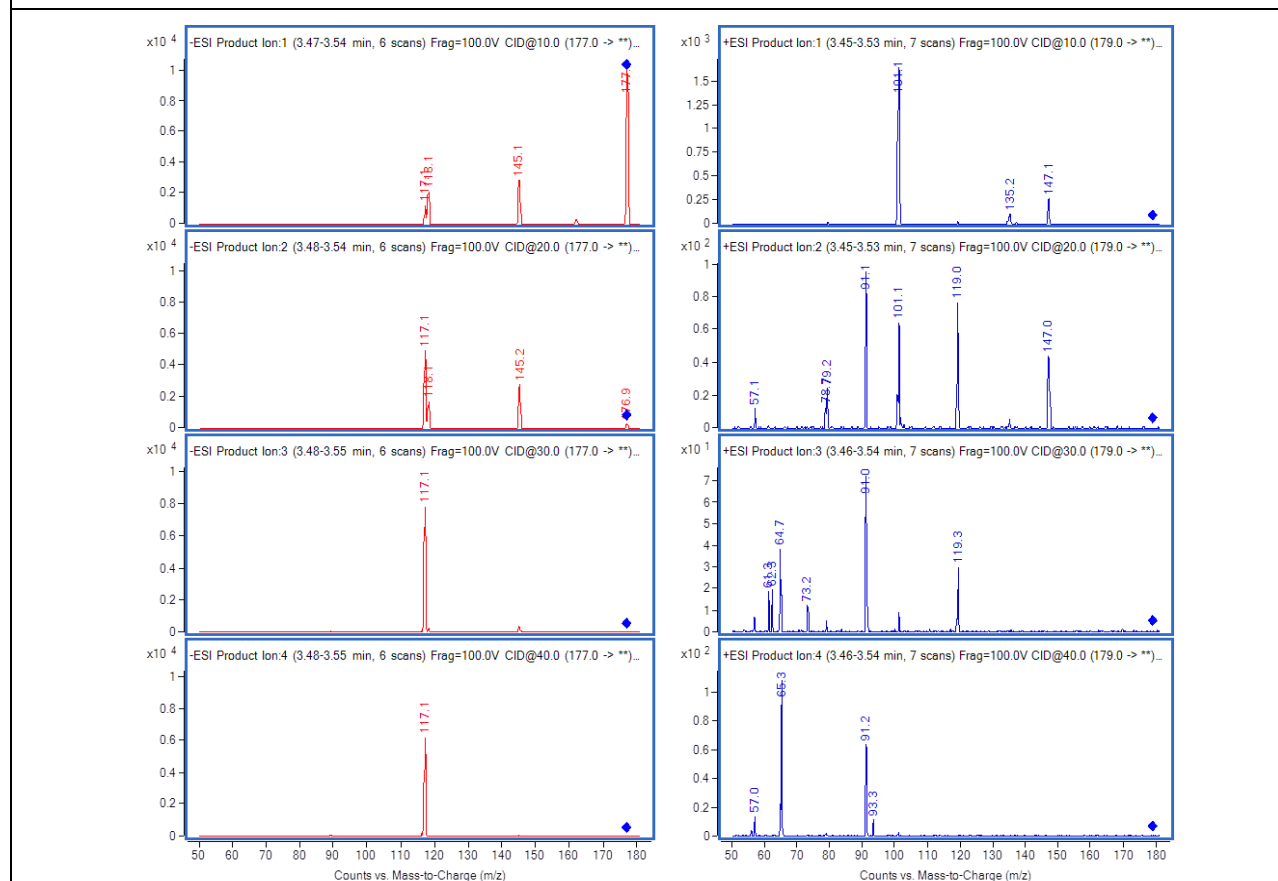
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P69 $t_r = 3,44$ $M_w = 430$		-

MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.

--



MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven)
pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.



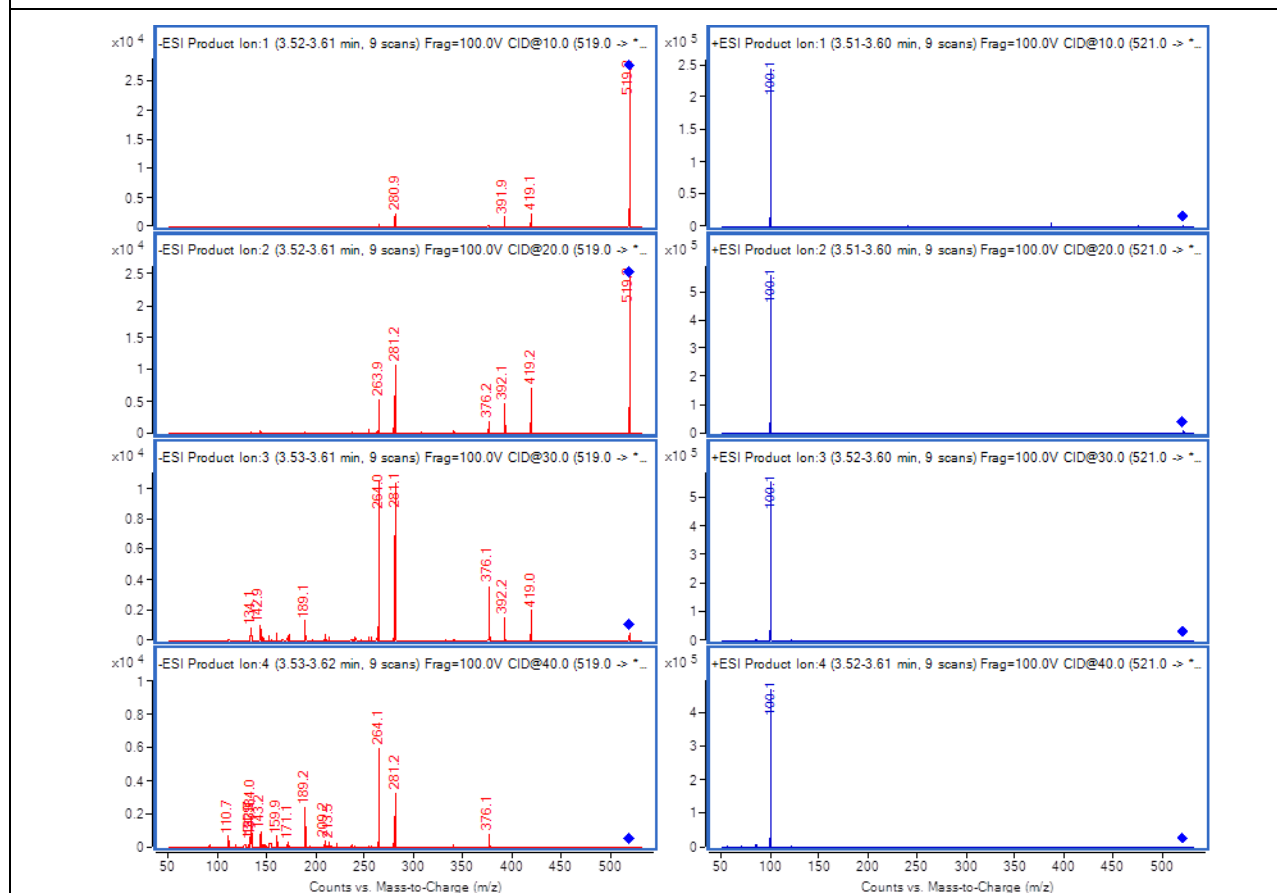
Oznaka pika	
P71 $t_r = 3,52$ $M_w = 516$	Isti UV, MS ¹ i MS ² spektri kao P65 i P67

Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P72 $t_r = 3,58$ $M_w = 534$		-
MS ² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		
-		

Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P73 $t_r = 3,59$ $M_w = 200$		-
MS ² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		
-		

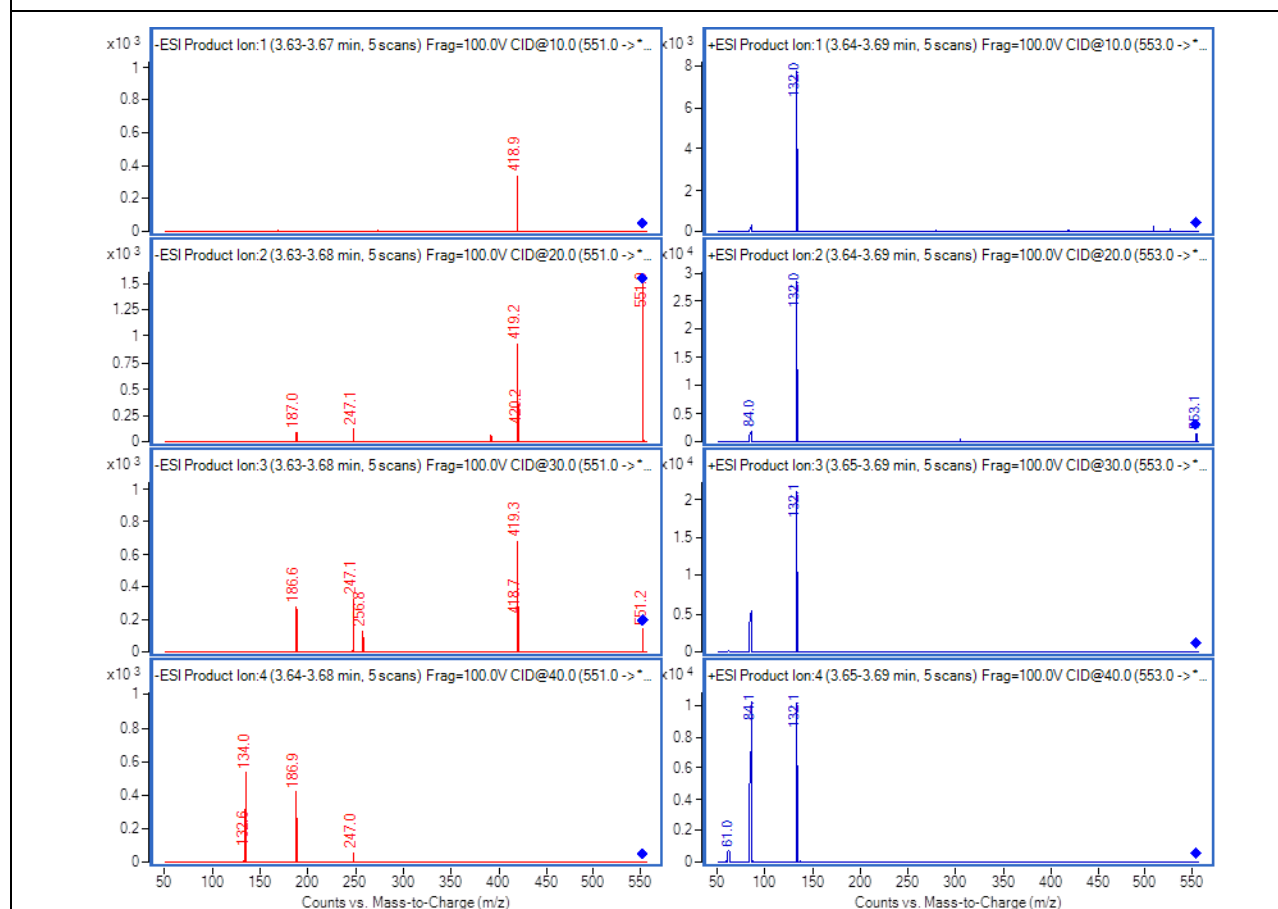
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P74 $t_r = 3,63$ $M_w = 520$	<p>+ESI Scan (3.55 min) Frag=100.0V P.judaica1-koren_10_scan(+).d 521 [M+H]⁺ x10⁶ 4 3 2 1 0 500 520 540 560 580 600 620 640 Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p> <p>-ESI Scan (3.57 min) Frag=100.0V P.judaica1-koren_10_scan(-).d 519 [M-H]⁻ x10⁵ 2 1.5 1 0.5 0 500 520 540 560 580 600 620 640 Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	-

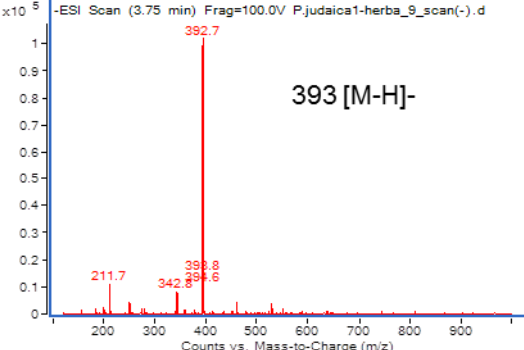
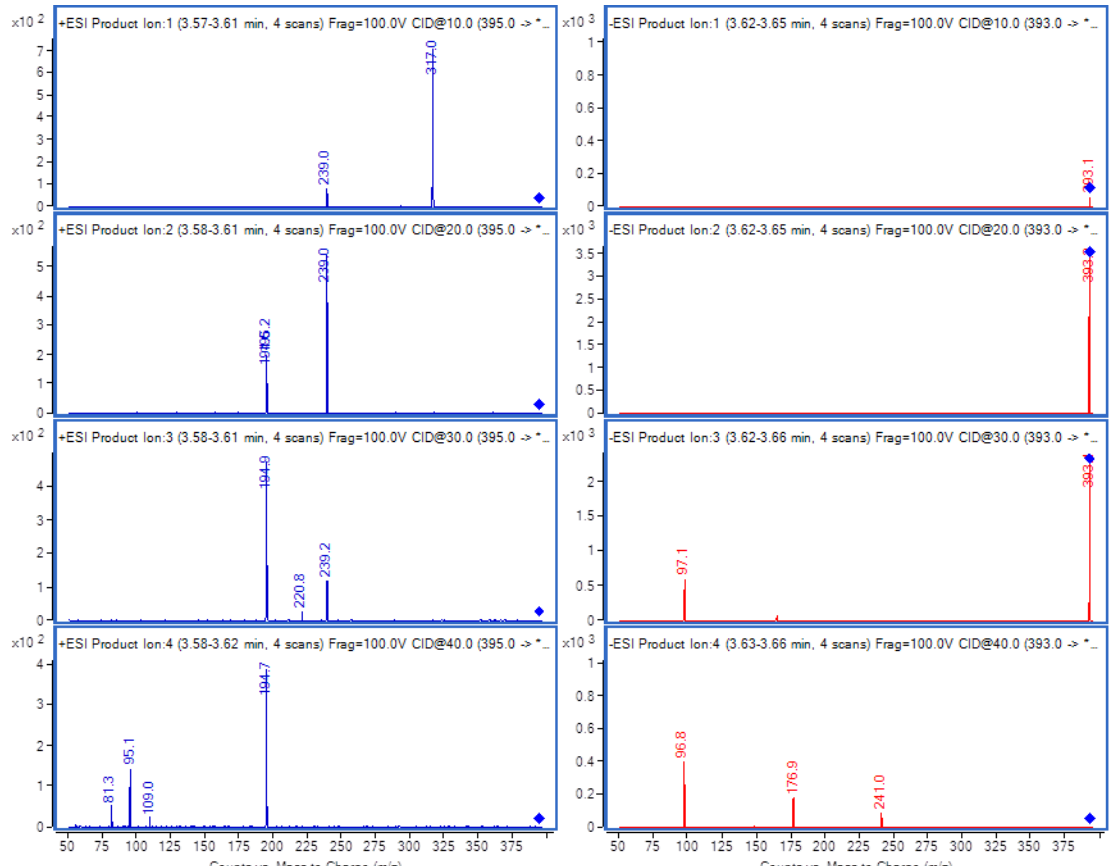
MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven)
 pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.

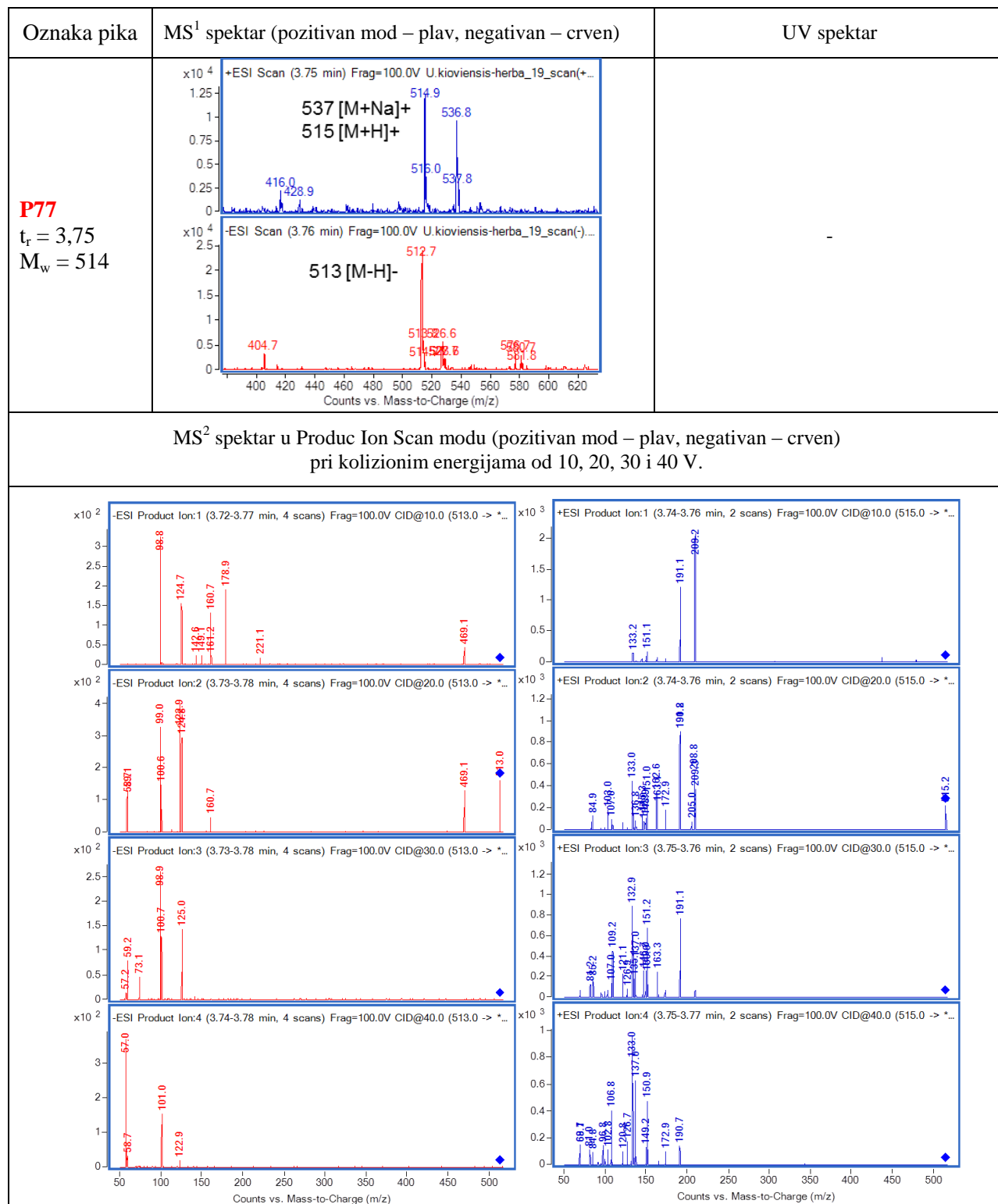


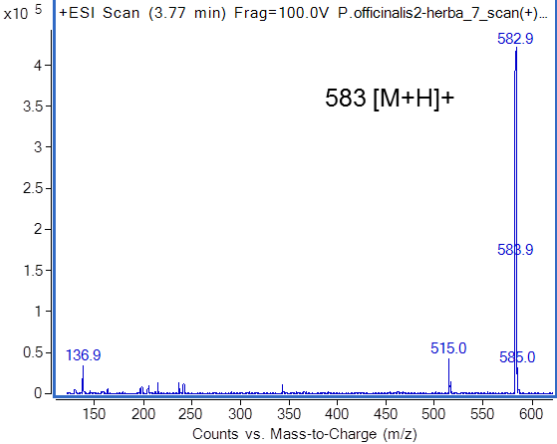
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P75 $t_r = 3,66$ $M_w = 552$		-

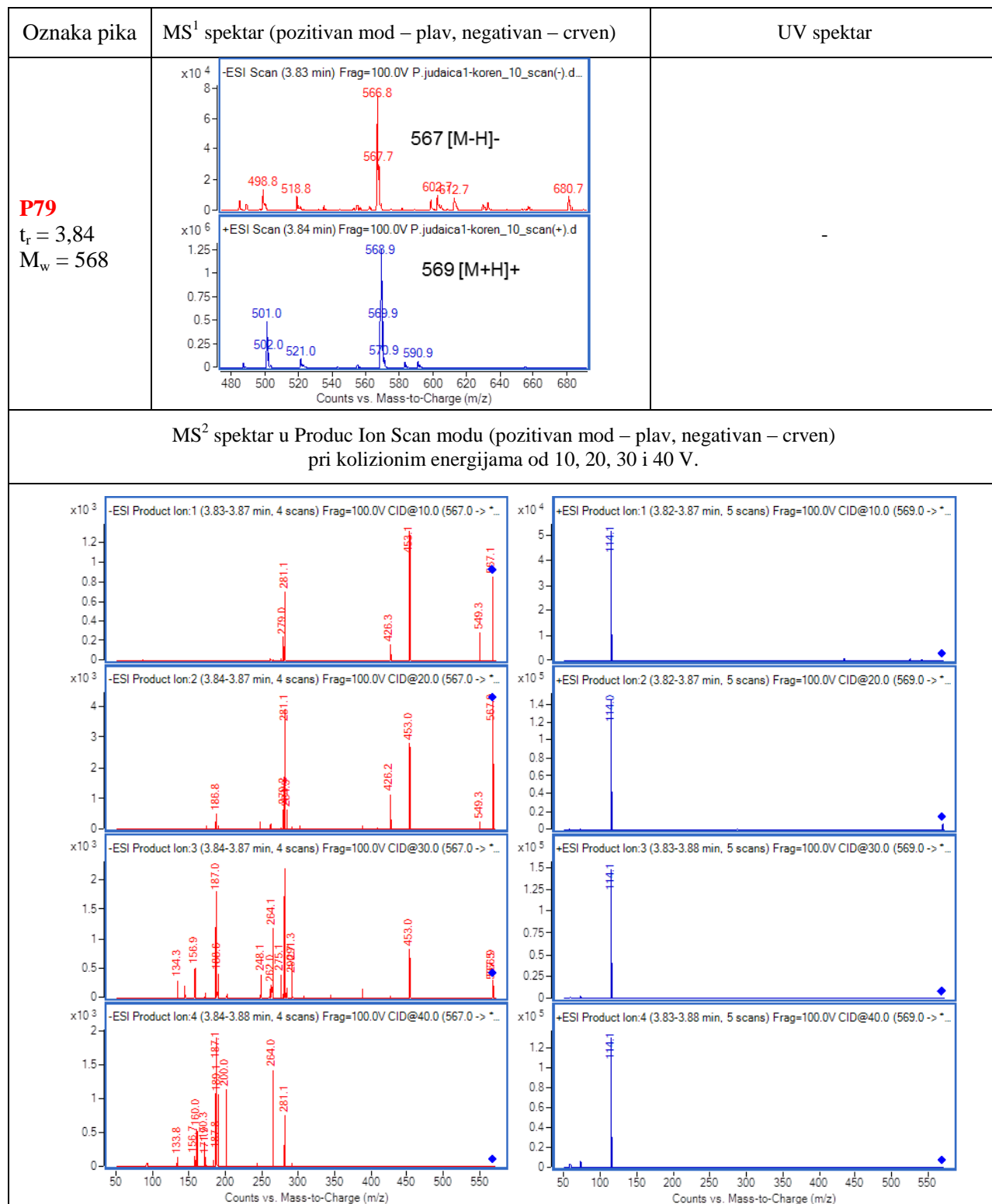
MS² spektar u Product Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven)
pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.

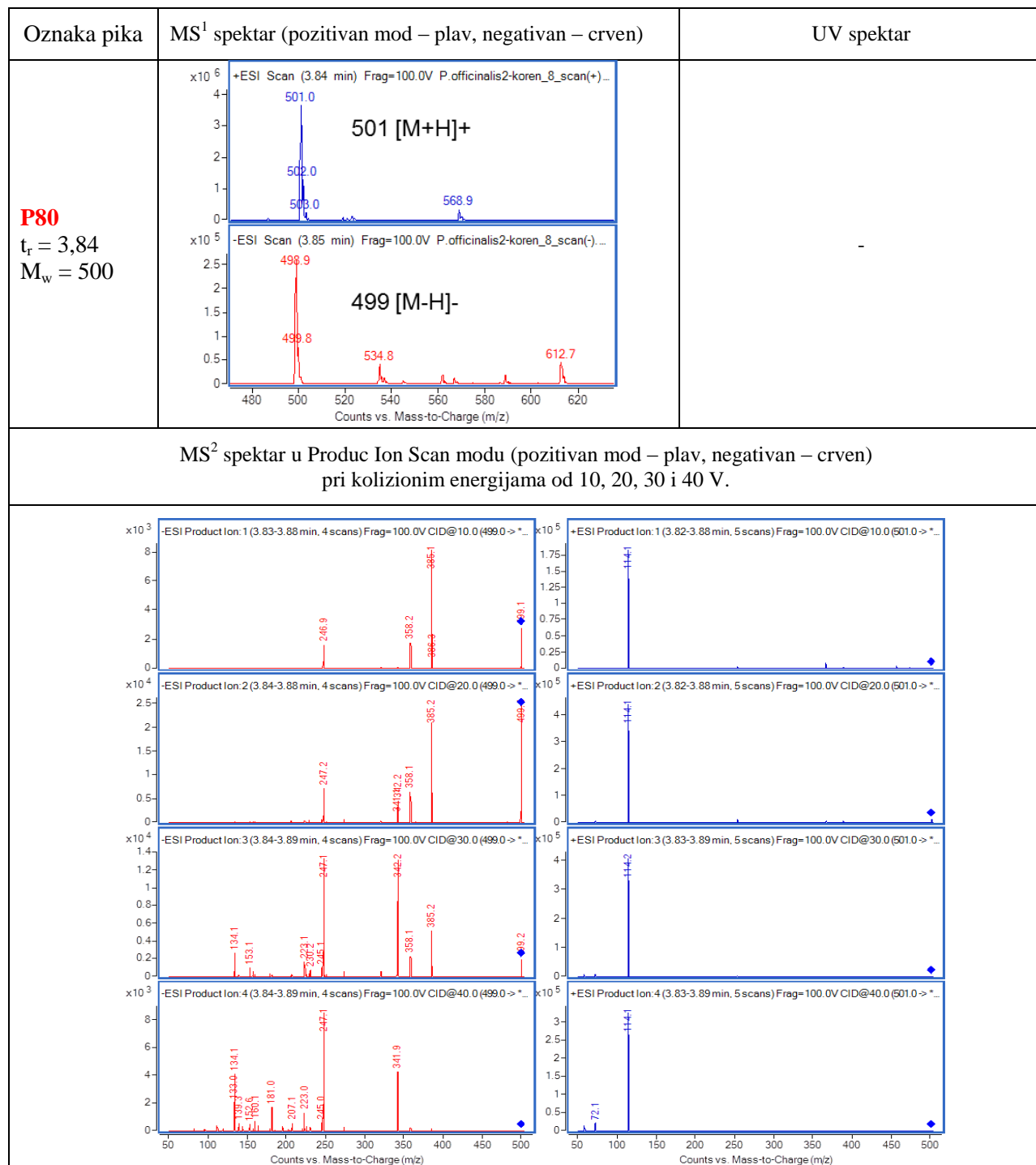


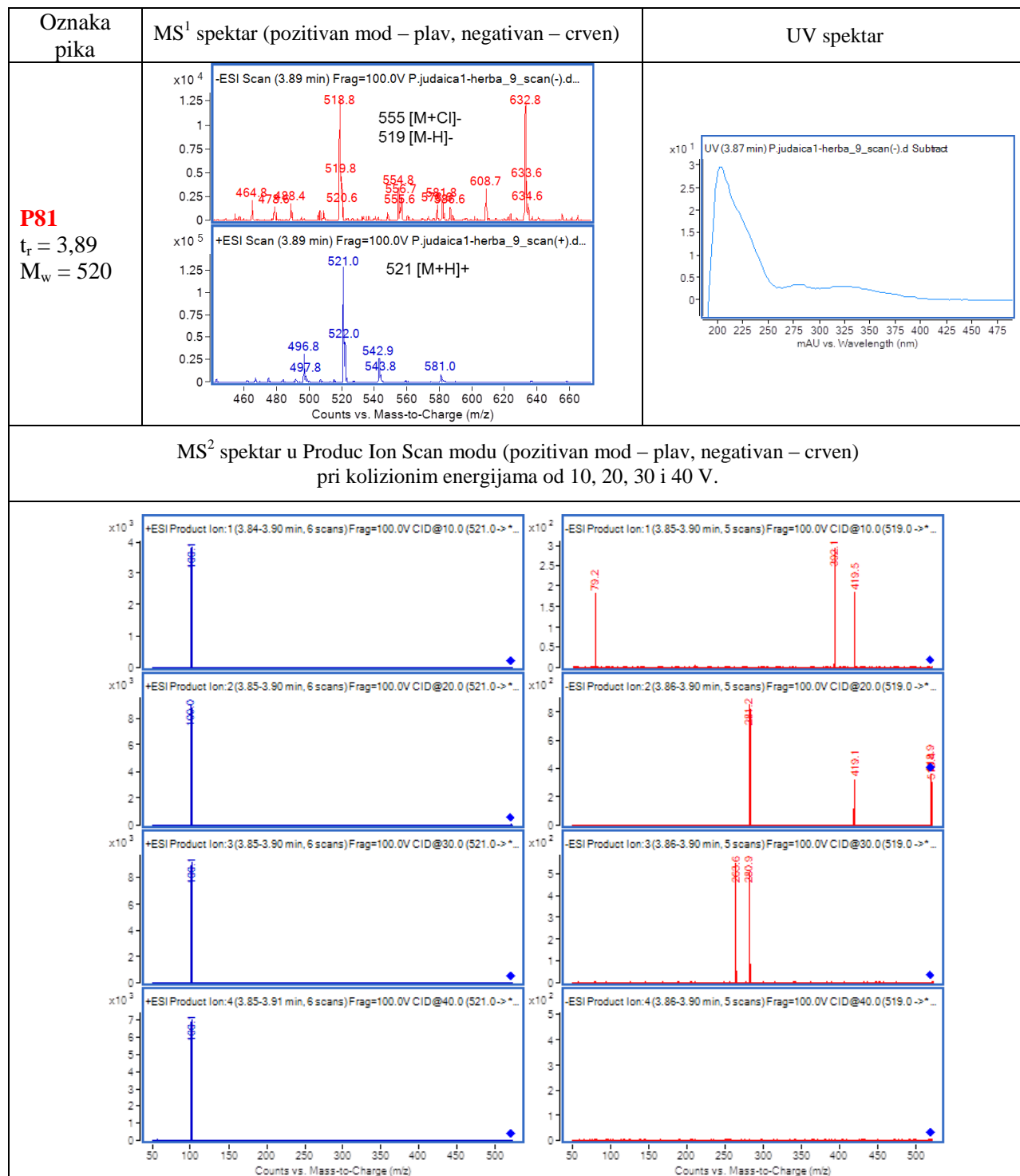
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P76 $t_r = 3,75$ $M_w = 394$</p>	 <p>-ESI Scan (3.75 min) Frag=100.0V P:judaica1-herba_9_scan(-).d</p> <p>393 [M-H]-</p>	-
MS ² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		
		



Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P78 $t_r = 3,77$ $M_w = 582$	 <p>+ESI Scan (3.77 min) Frag=100.0V P.officinalis2-herba_7_scan(+)... 583 [M+H] Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	-
MS ² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		
-		

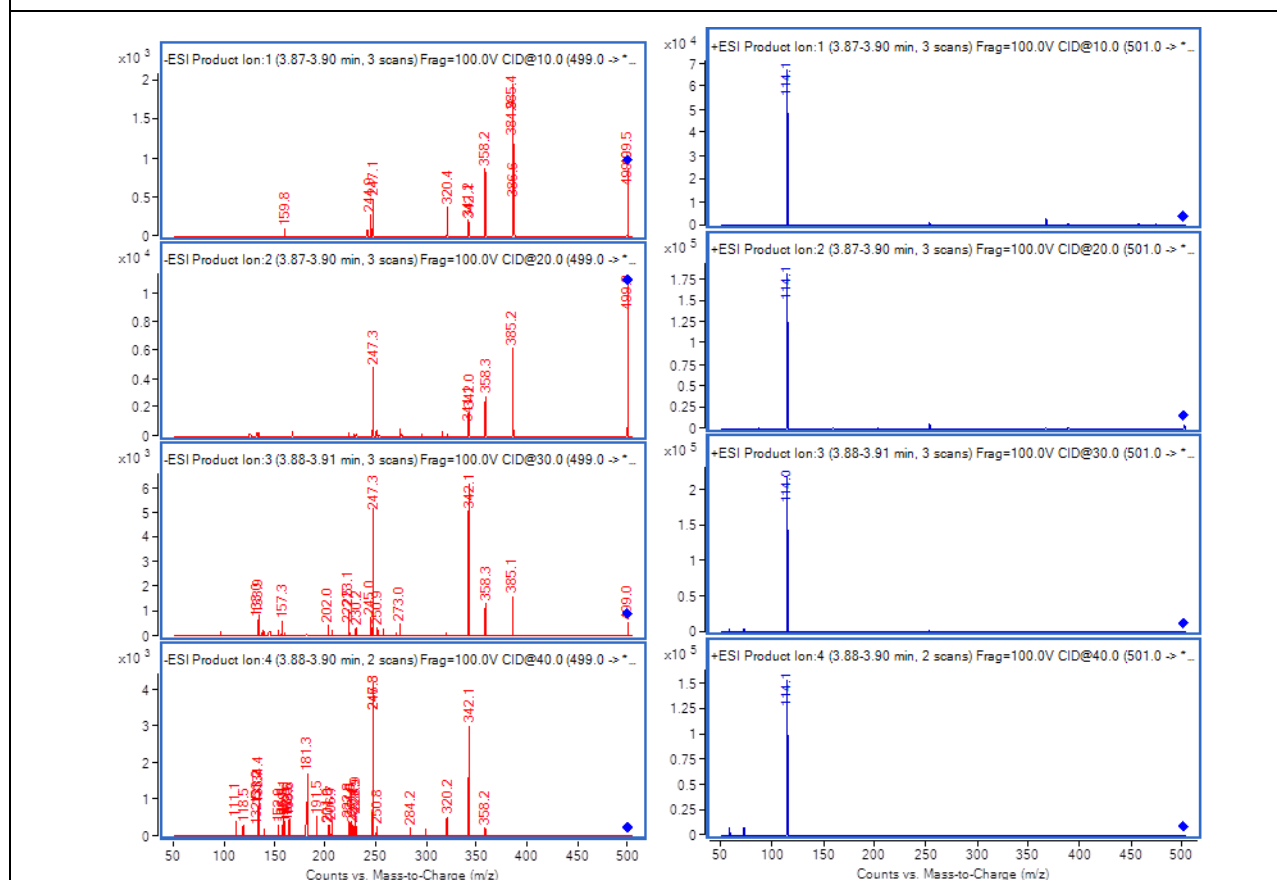


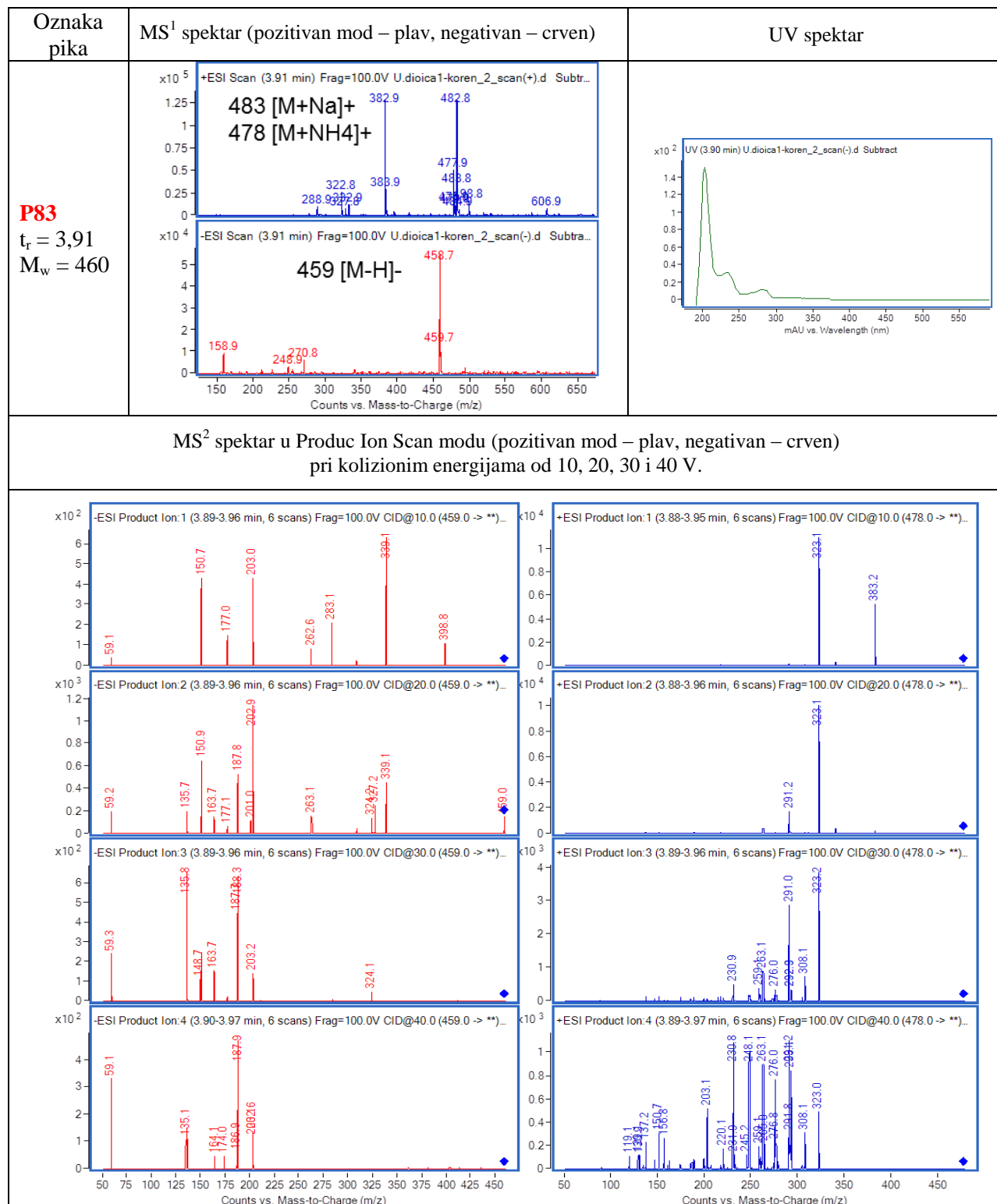


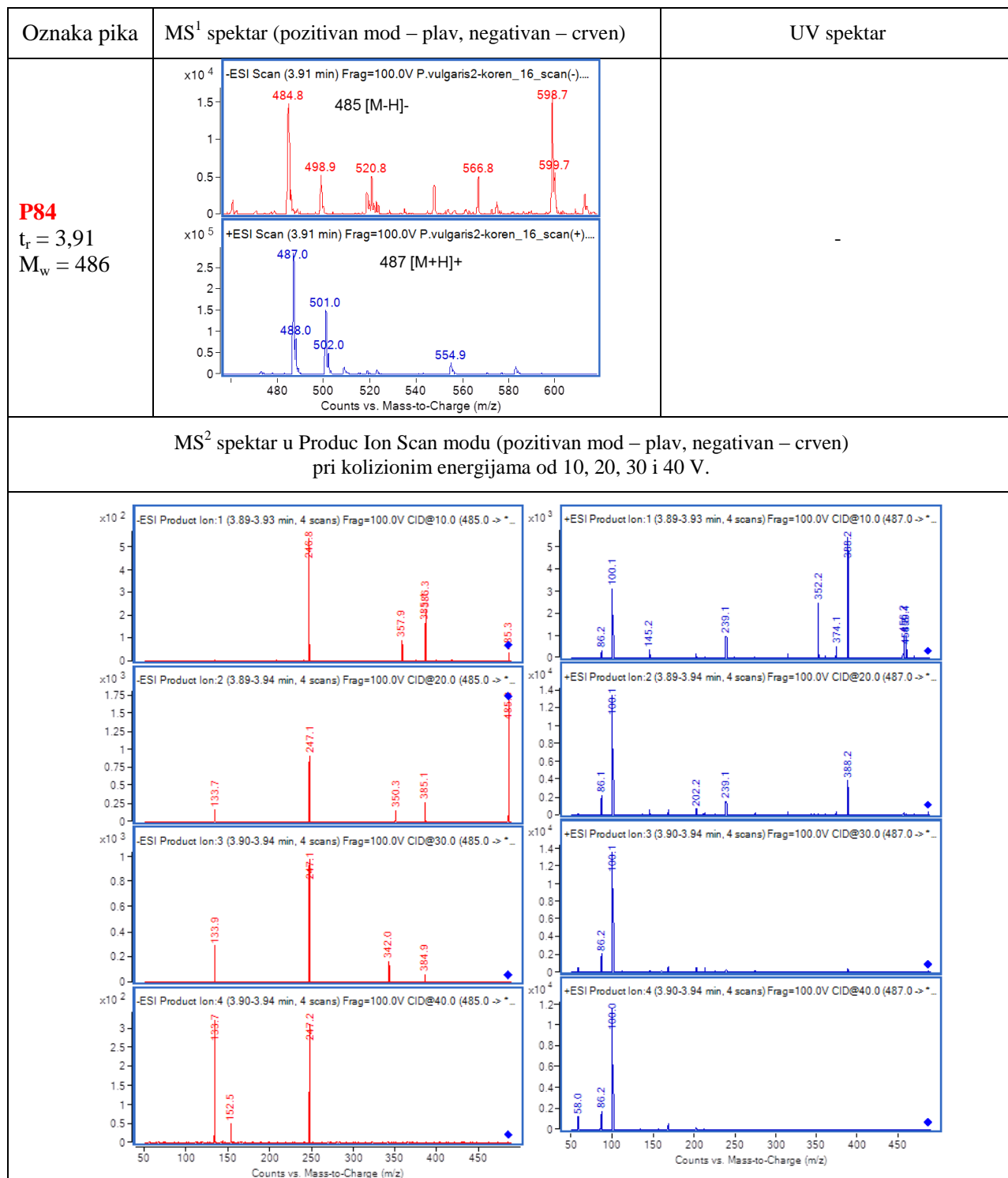


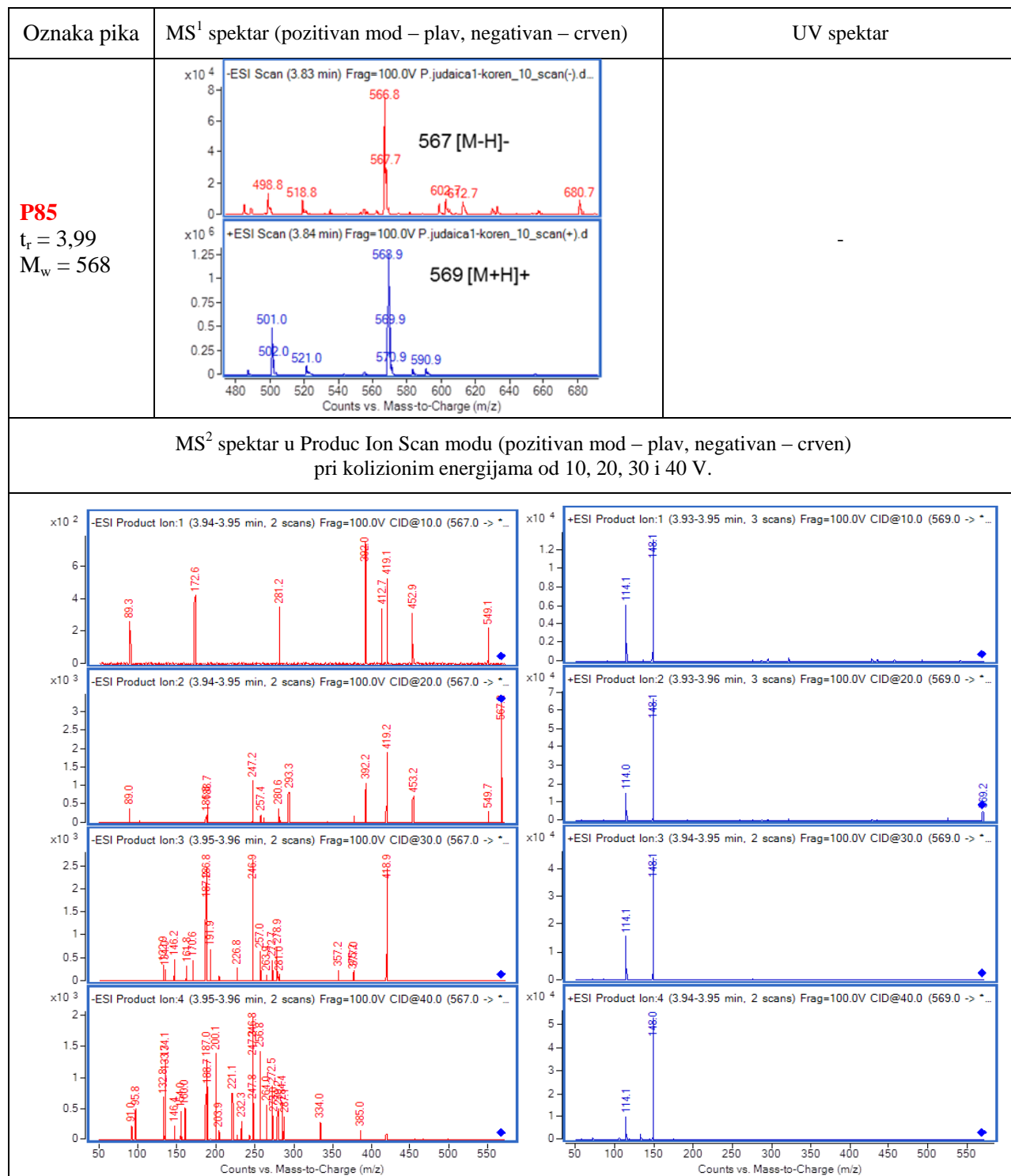
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P82 $t_r = 3,91$ $M_w = 500$	<p>499 [M-H]⁻</p> <p>501 [M+H]⁺</p>	-

MS² spektar u Product Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven)
pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.

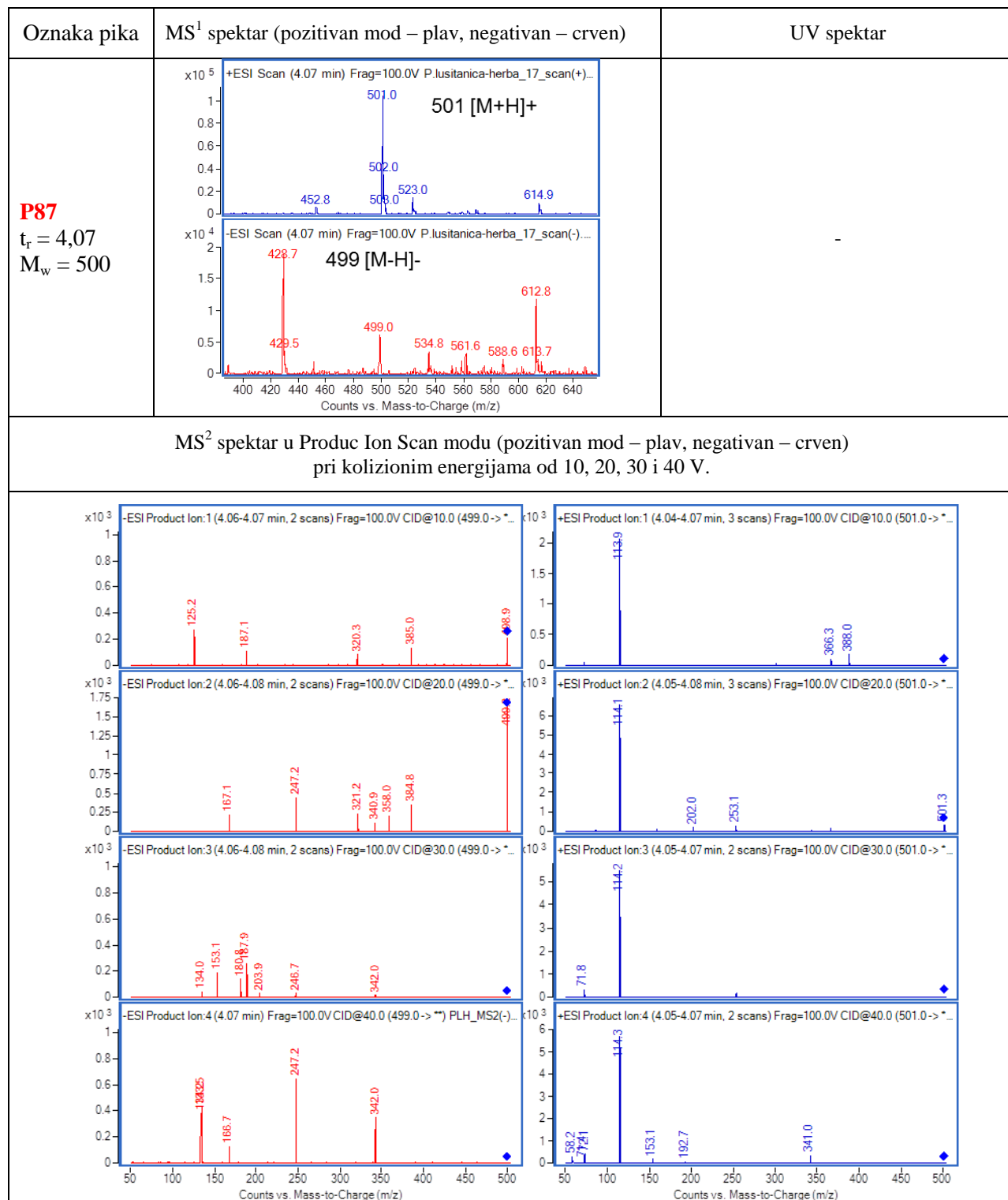


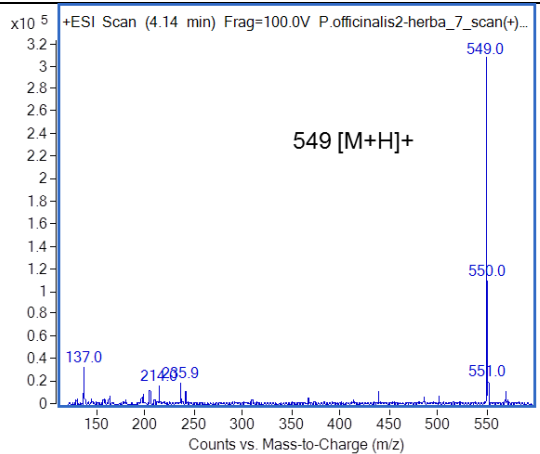


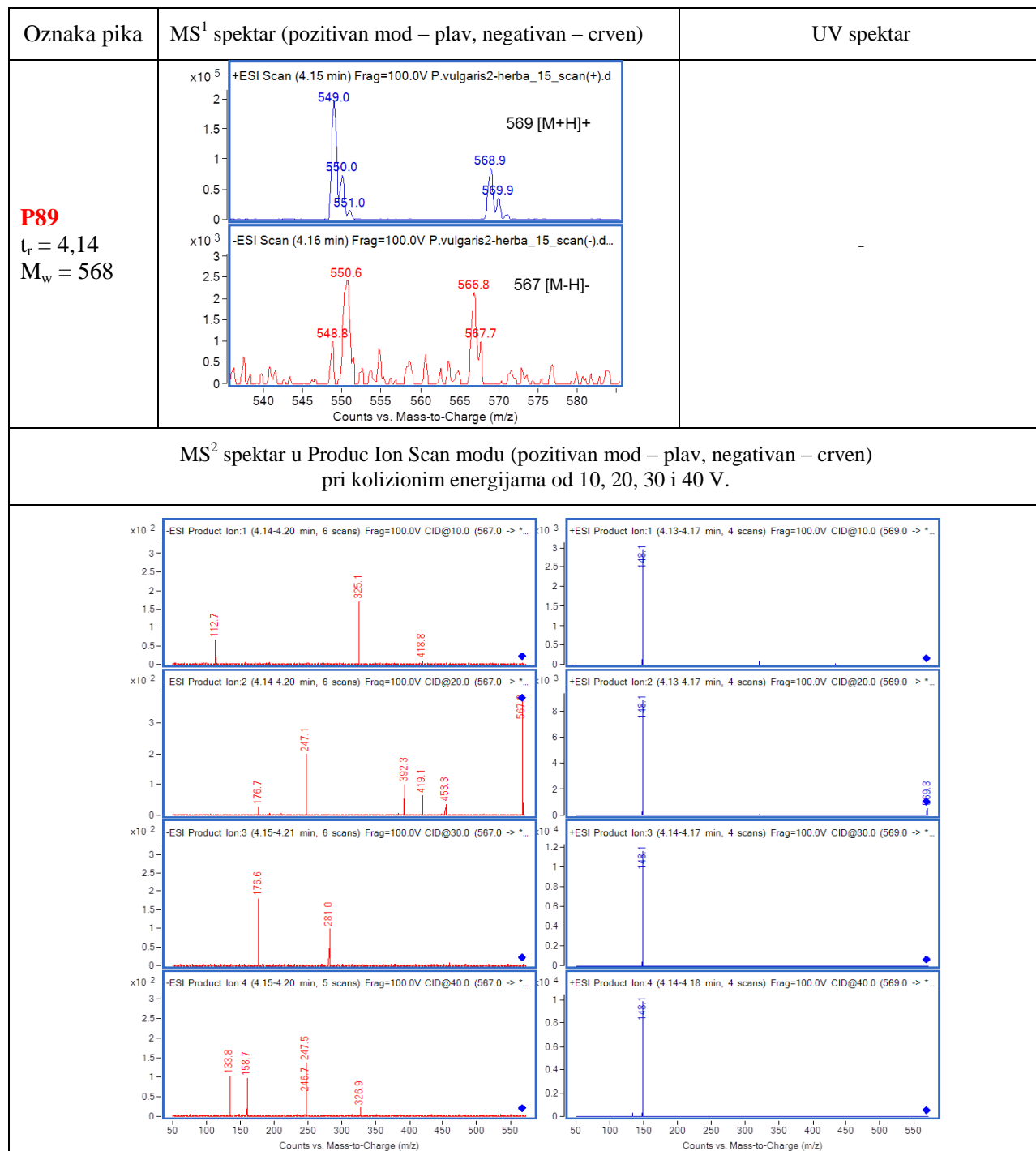


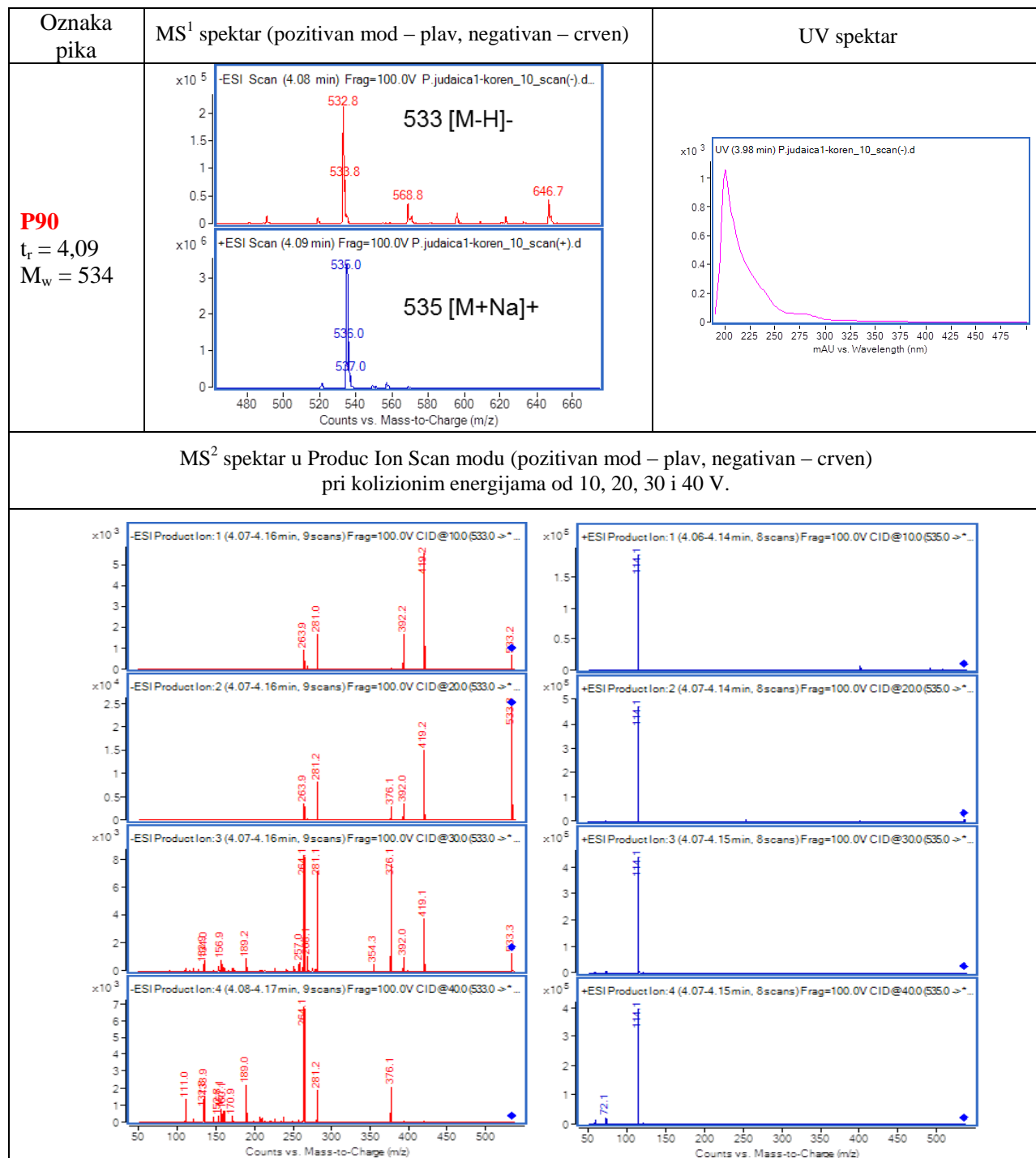


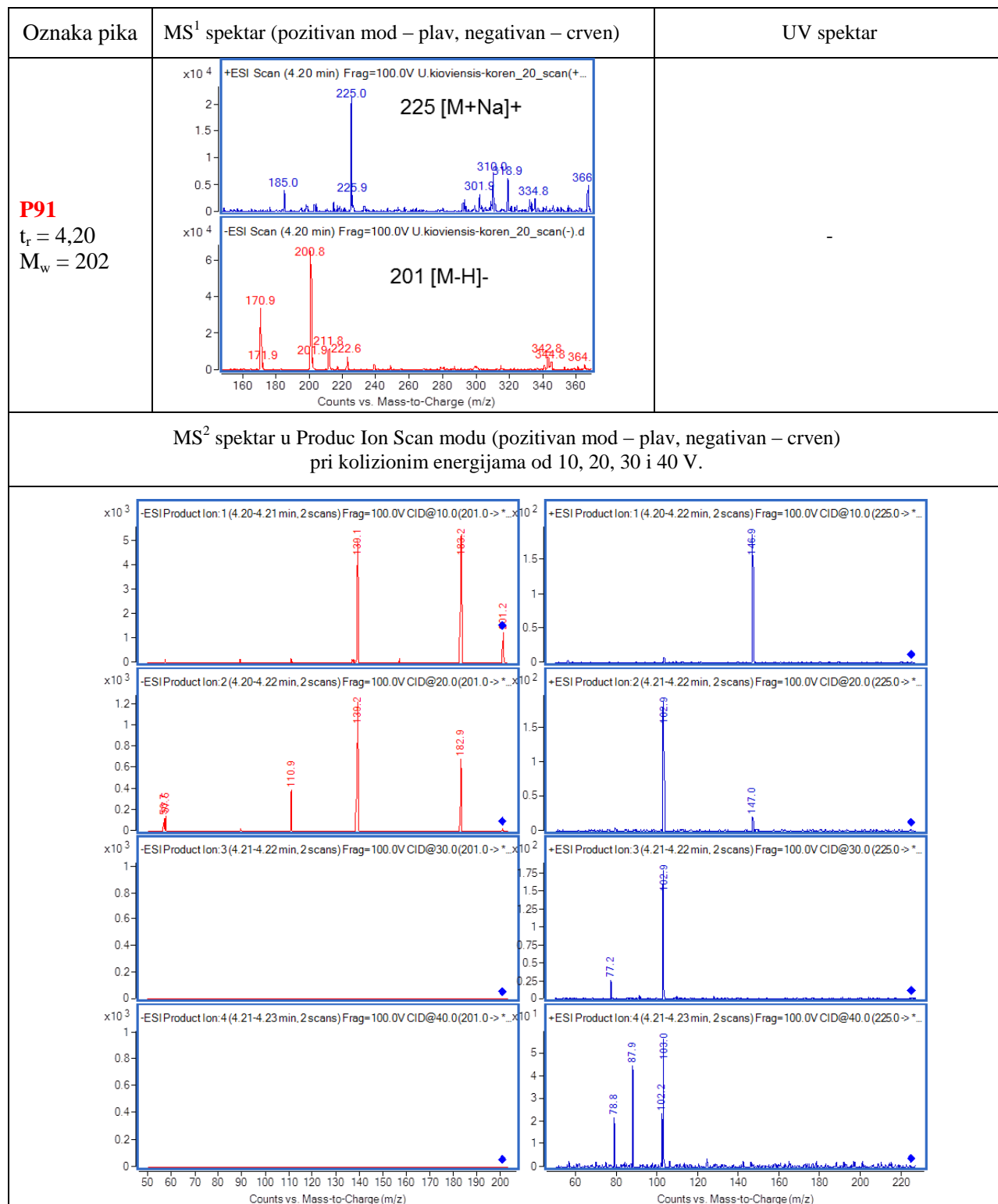
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P86 $t_r = 4,01$ $M_w = 548$	<p>+ESI Scan (4.01 min) Frag=100.0V P.lusitanica-koren_18_scan(...)</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	-
MS ² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		
<p>+ESI Product Ion:1 (3.98-4.04 min, 6 scans) Frag=100.0V CID@10.0 (549.0 -> *...)</p> <p>+ESI Product Ion:2 (3.99-4.04 min, 6 scans) Frag=100.0V CID@20.0 (549.0 -> *...)</p> <p>+ESI Product Ion:3 (3.99-4.05 min, 6 scans) Frag=100.0V CID@30.0 (549.0 -> *...)</p> <p>+ESI Product Ion:4 (3.99-4.05 min, 6 scans) Frag=100.0V CID@40.0 (549.0 -> *...)</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>		

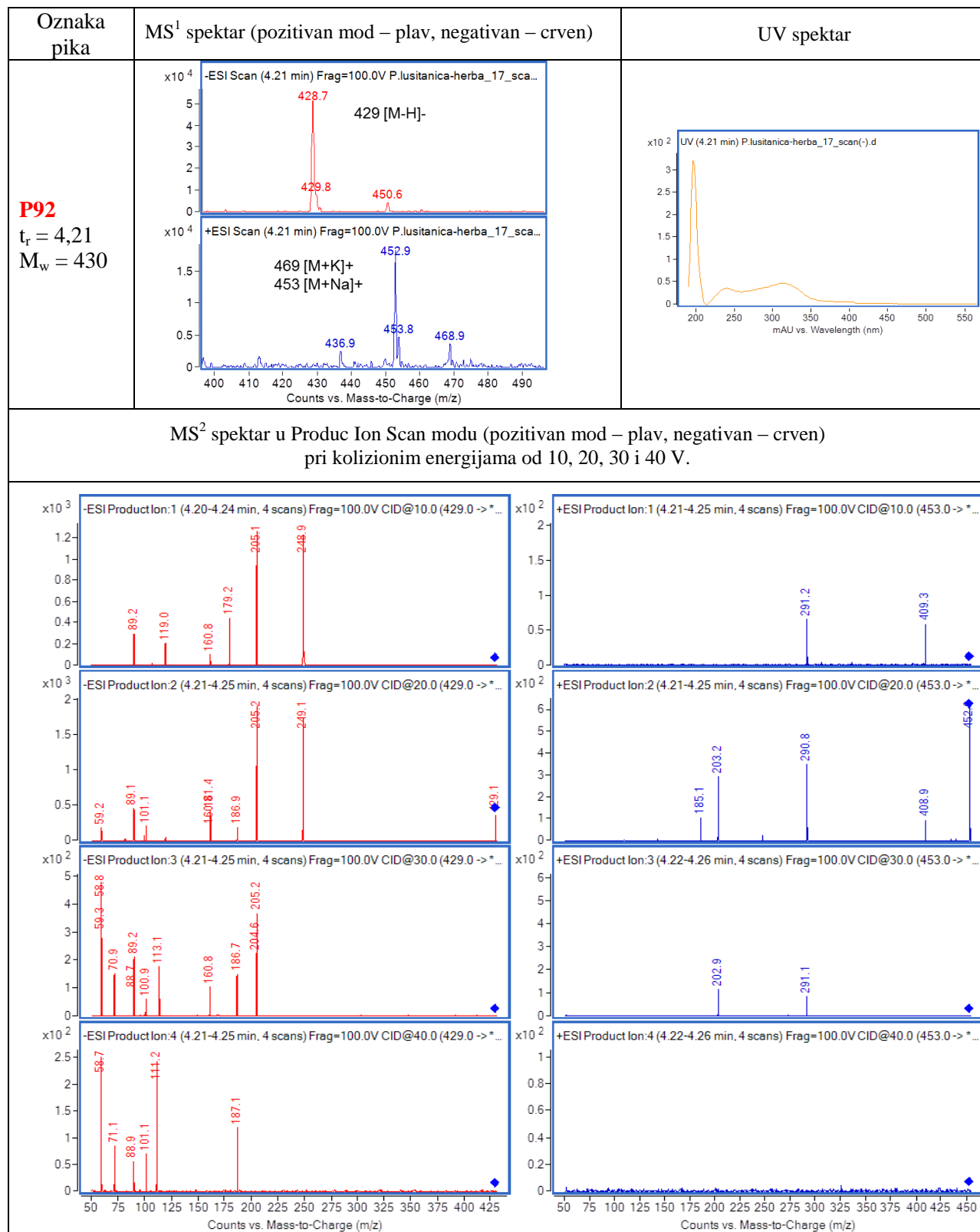


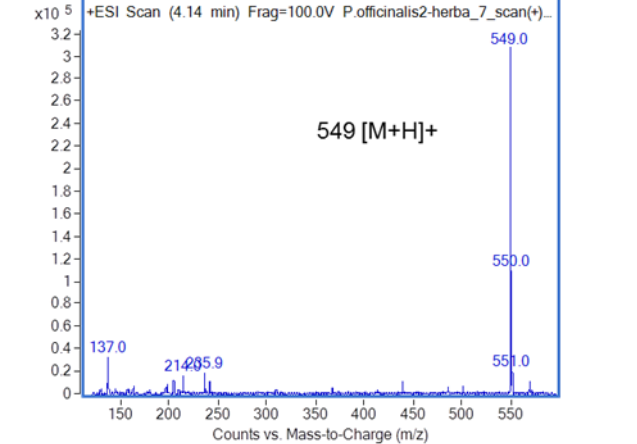
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P88 $t_r = 4,14$ $M_w = 548$	 <p>+ESI Scan (4.14 min) Frag=100.0V P.officialis2-herba_7_scan(+)... Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	-
MS ² spektar u Product Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		

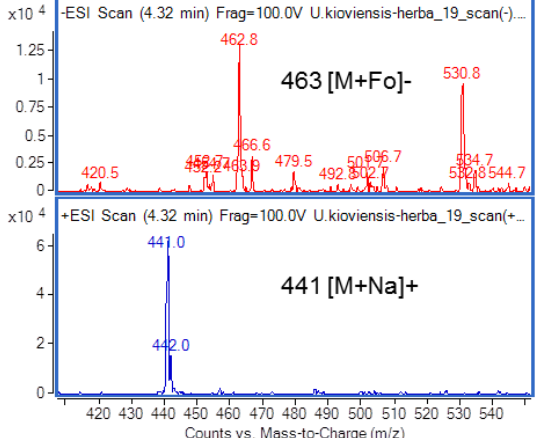
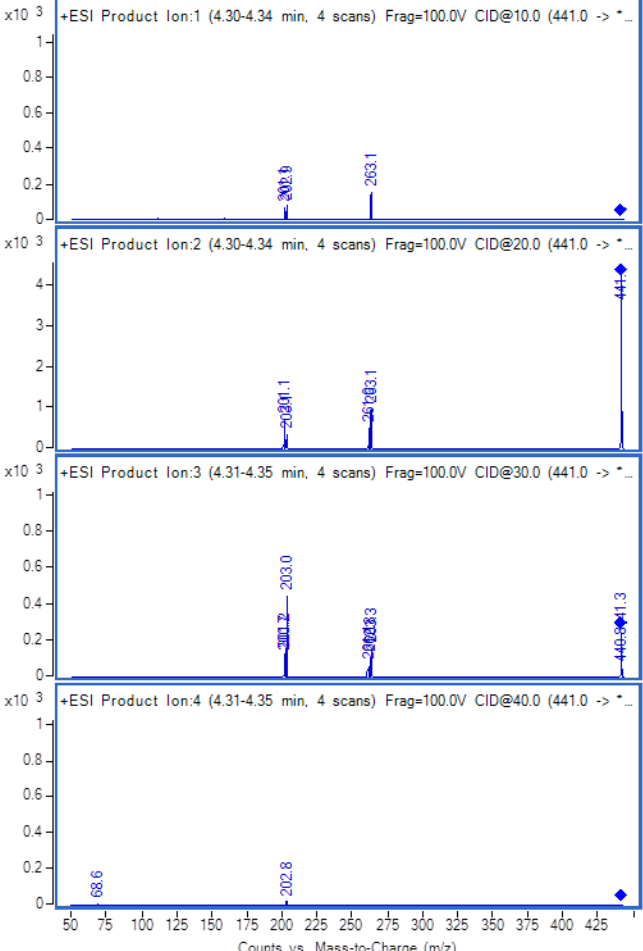


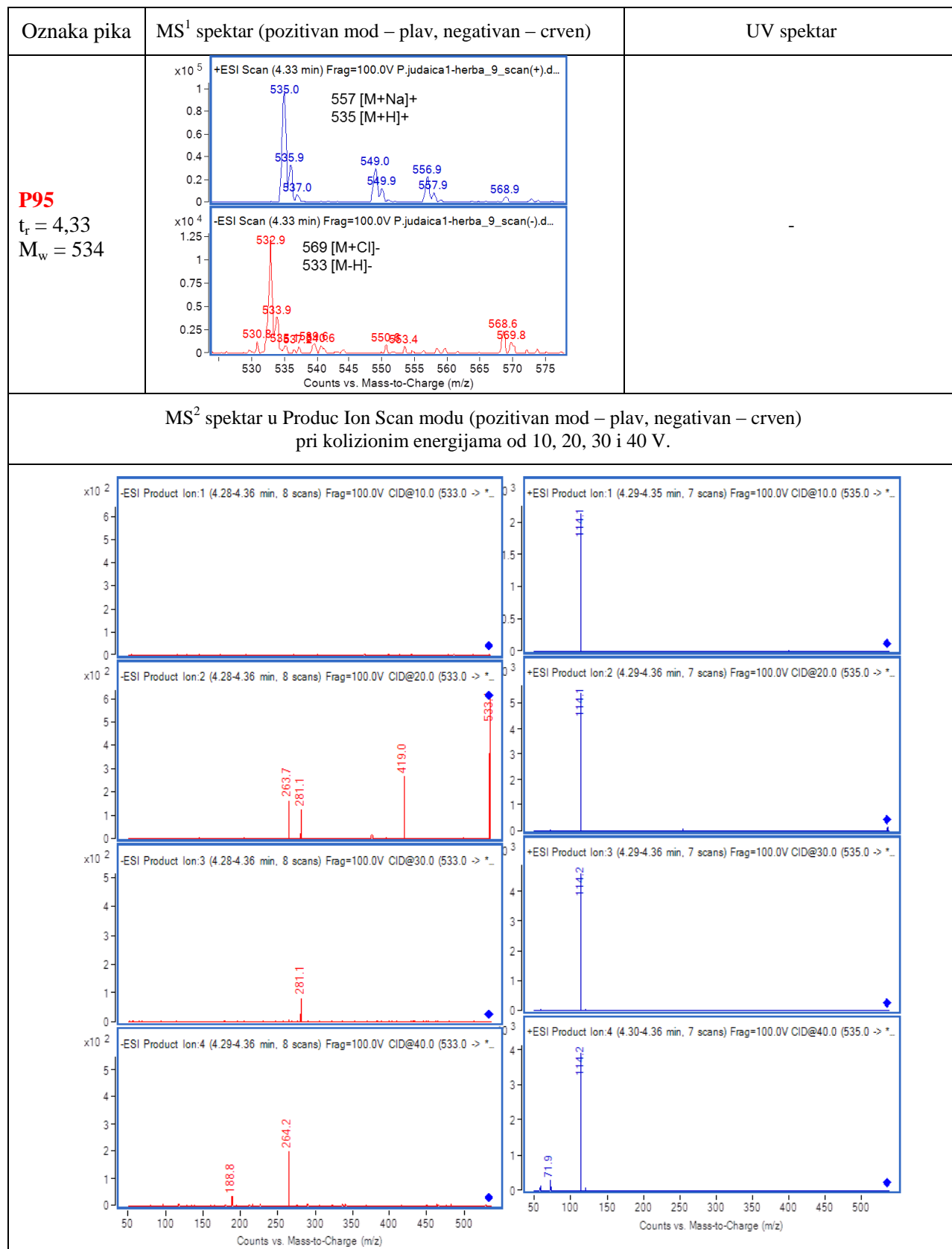


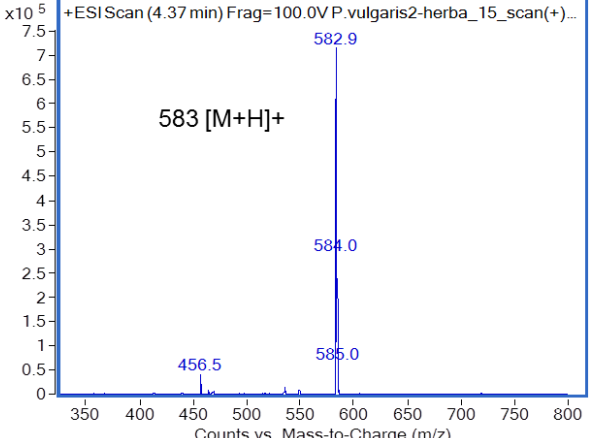


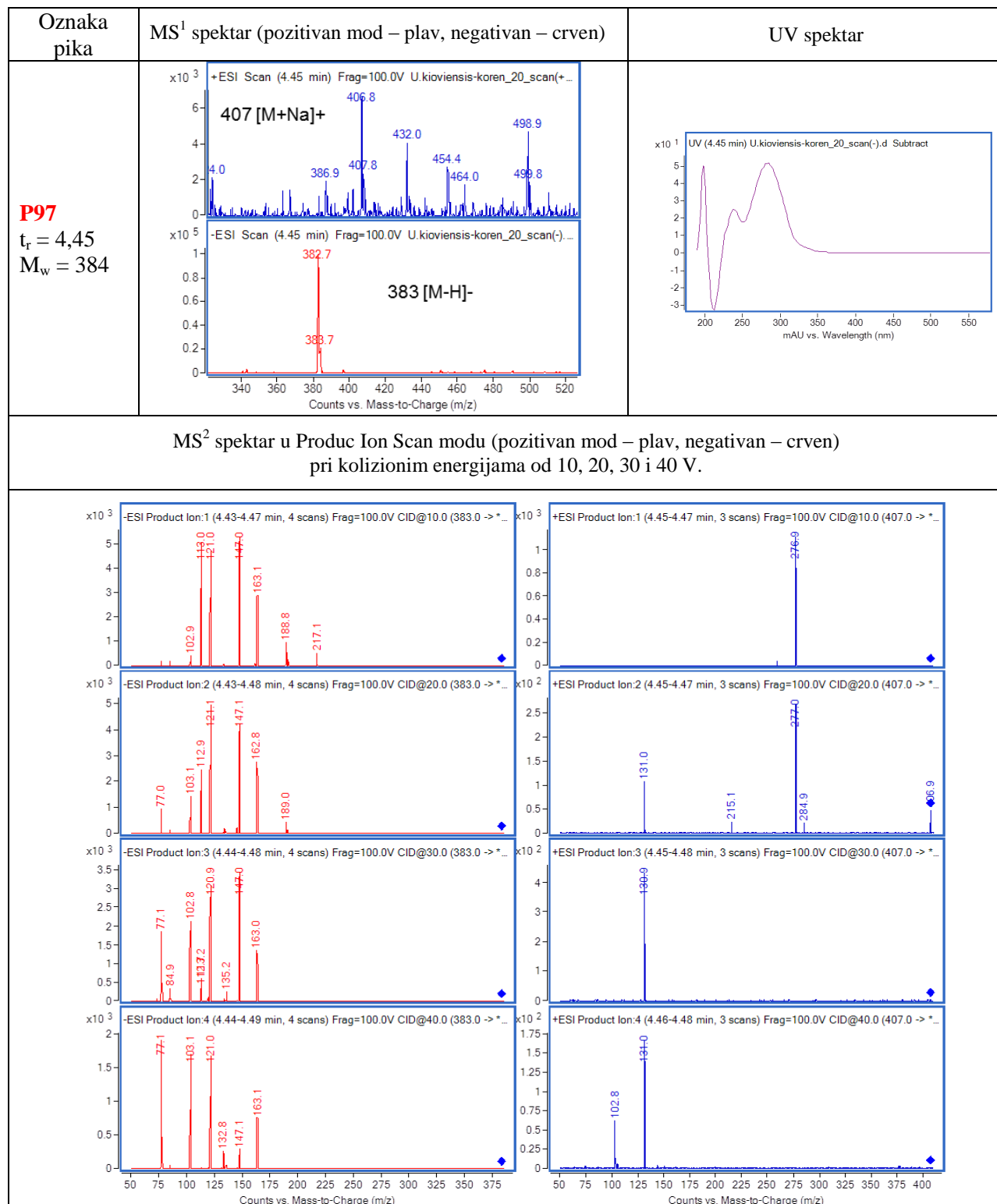


Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P93 $t_r = 4,27$ $M_w = 548$ Isto kao P88	 <p>+ESI Scan (4.14 min) Frag=100.0V P.officinalis2-herba_7_scan(+)_</p> <p>549 [M+H]⁺</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	-
MS ² spektar u Product Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		

Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P94 $t_r = 4,32$ $M_w = 418$</p>		-
MS ² spektar u Product Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		
		

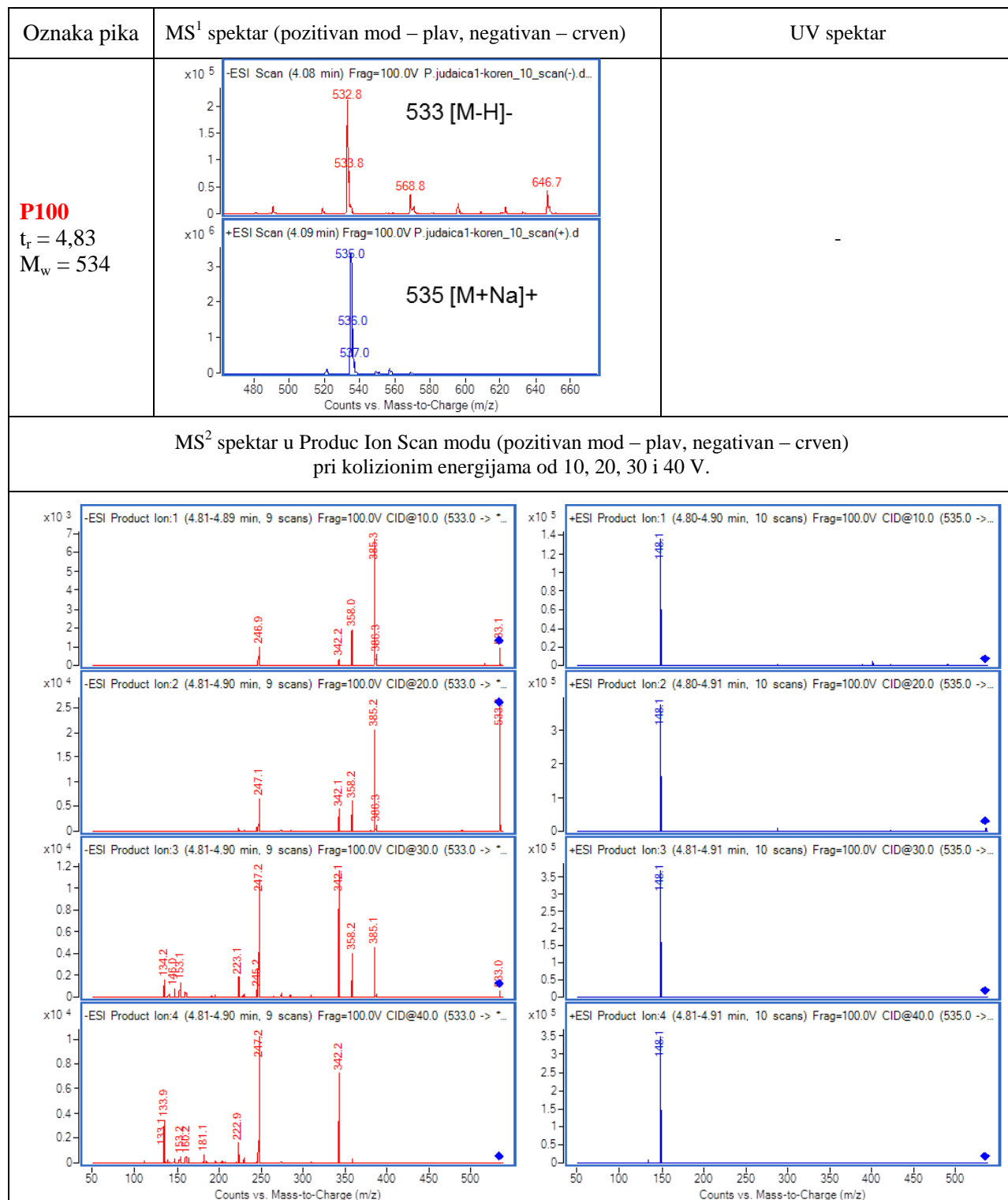


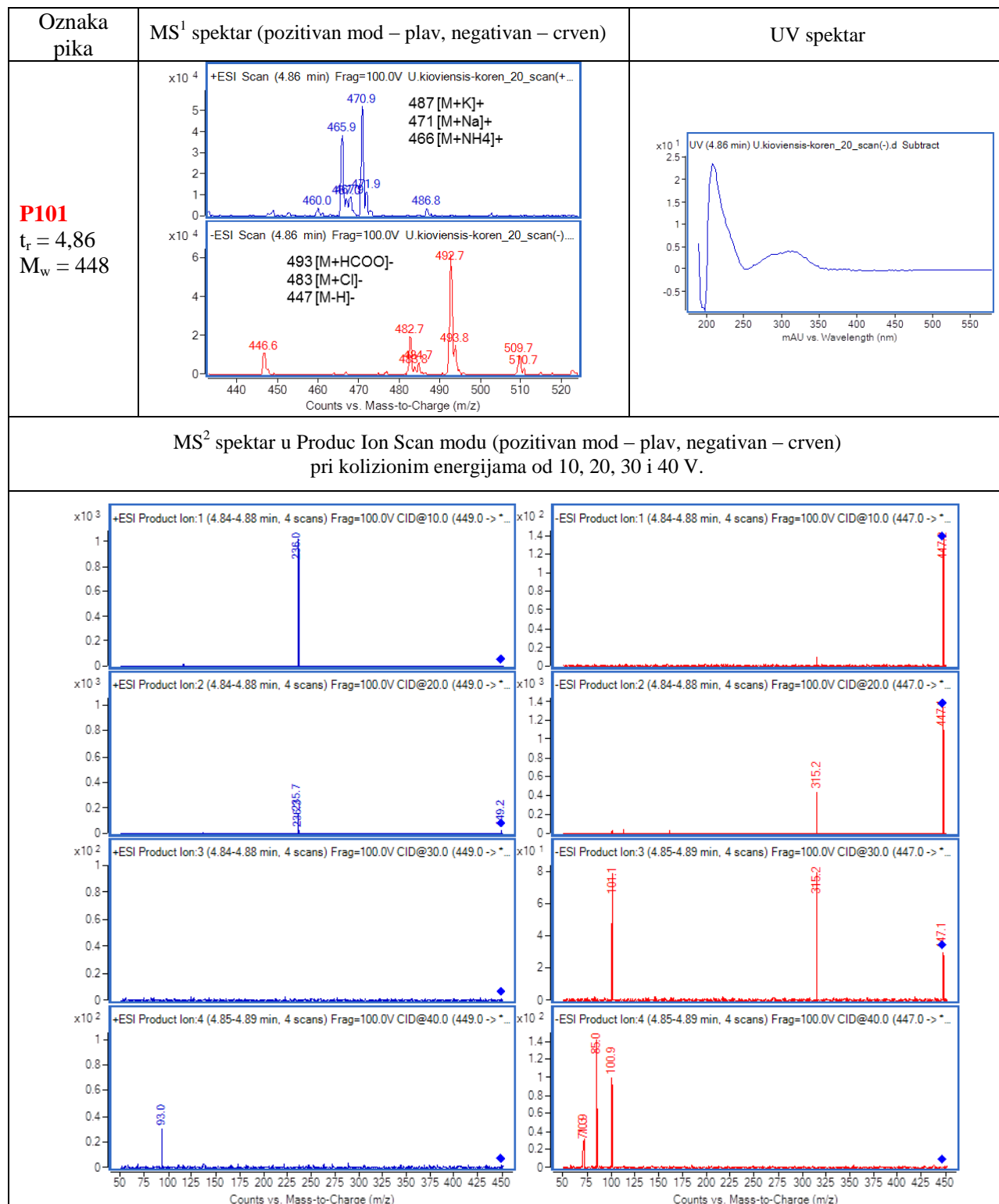
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P96 $t_r = 4,37$ $M_w = 582$</p>	 <p>+ESI Scan (4.37 min) Frag=100.0V P.vulgaris2-herba_15_scan(+)...</p> <p>583 [M+H]⁺</p> <p>456.5, 582.9, 584.0, 585.0</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	-
<p>MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.</p>		
-		

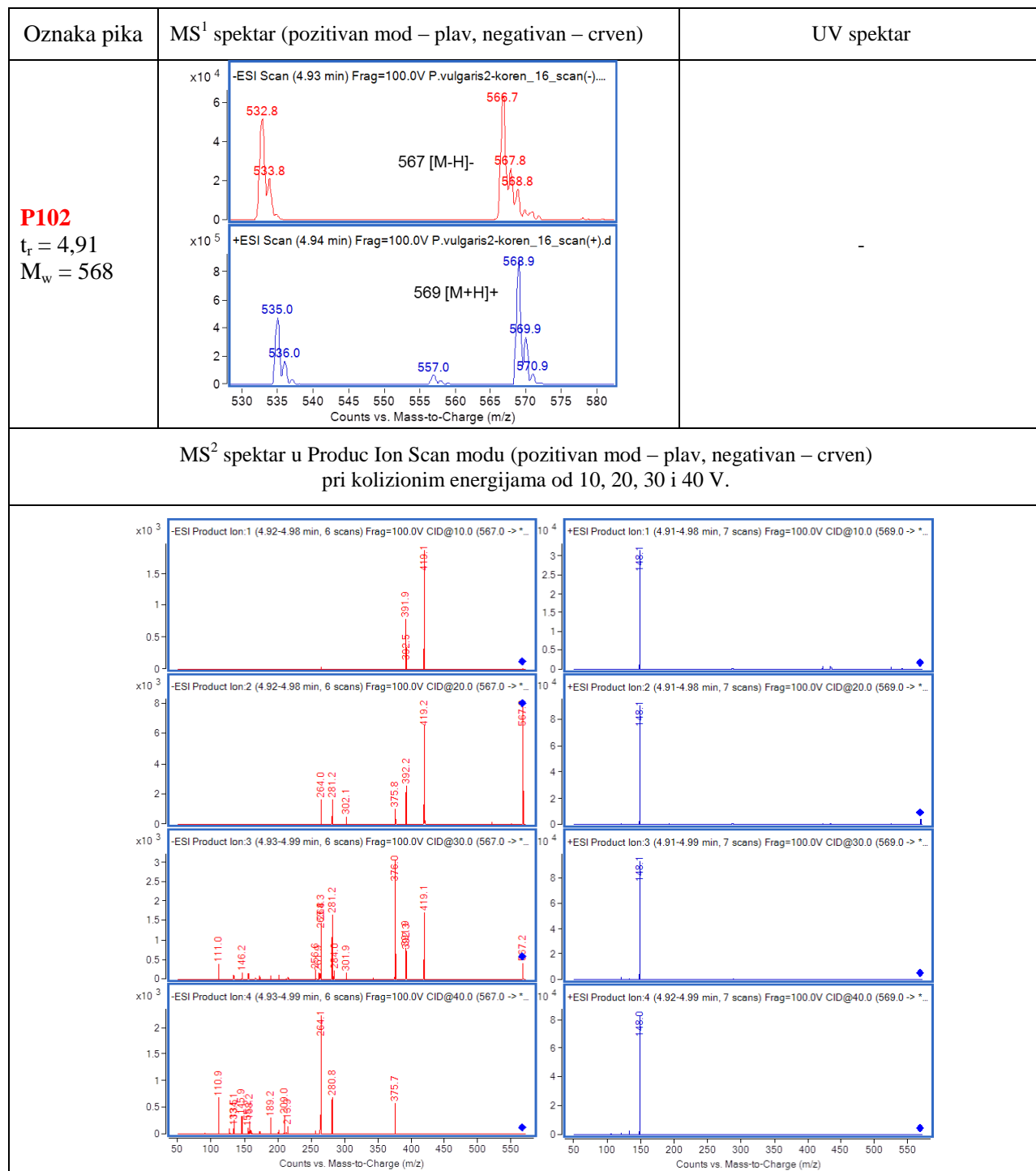


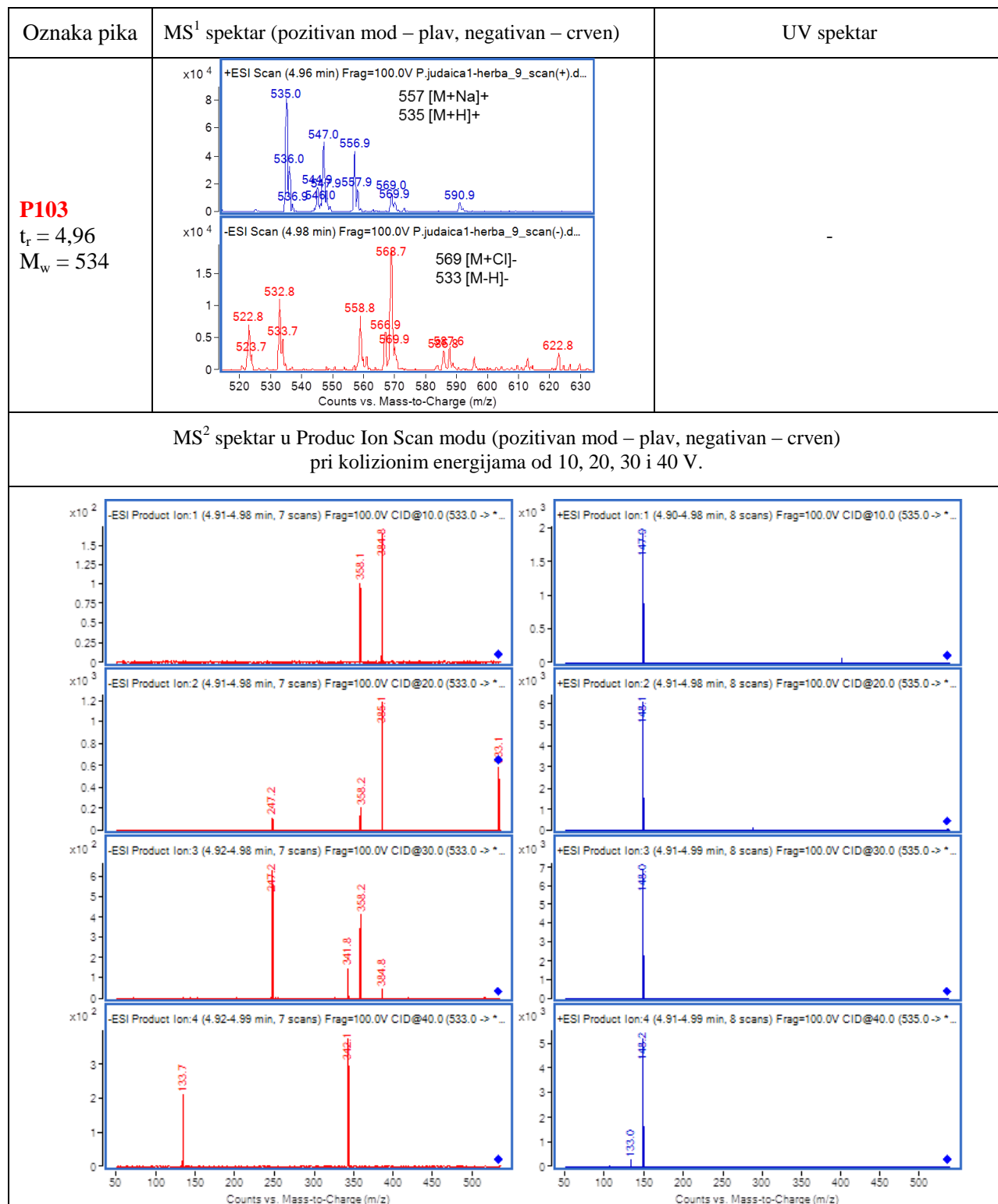
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P98 $t_r = 4,49$ $M_w = 446$		-
MS ² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		
-		

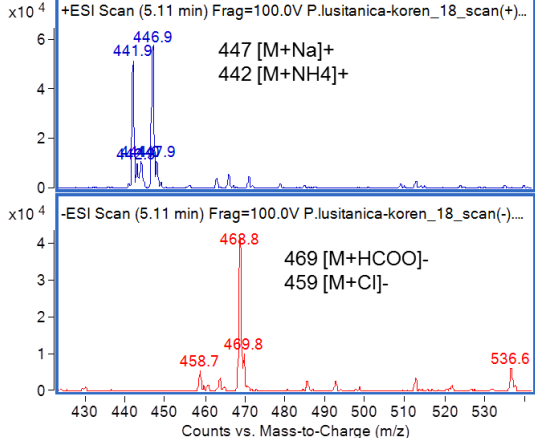
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P99 $t_r = 4,77$ $M_w = 550$		-
MS ² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		
-		

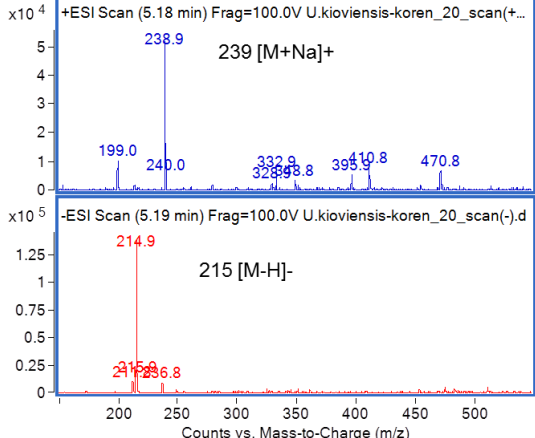
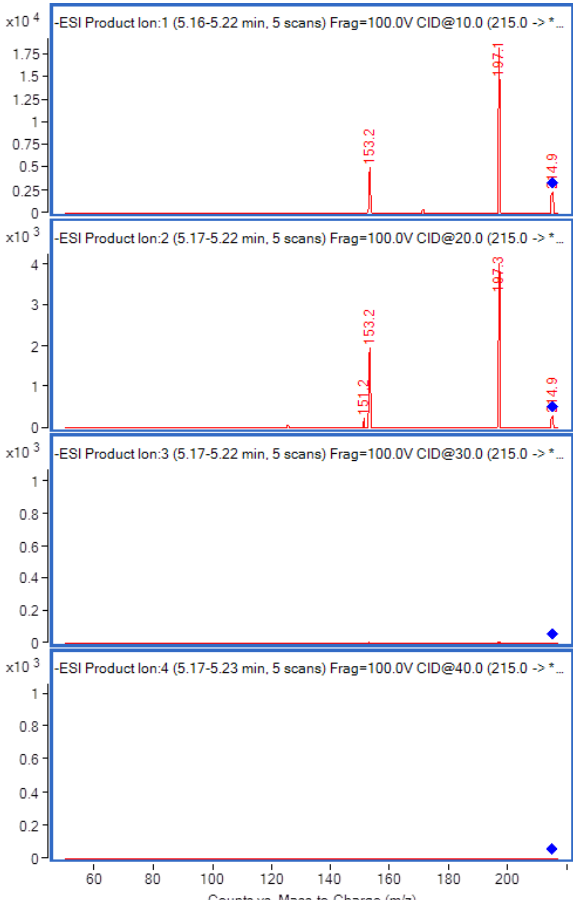








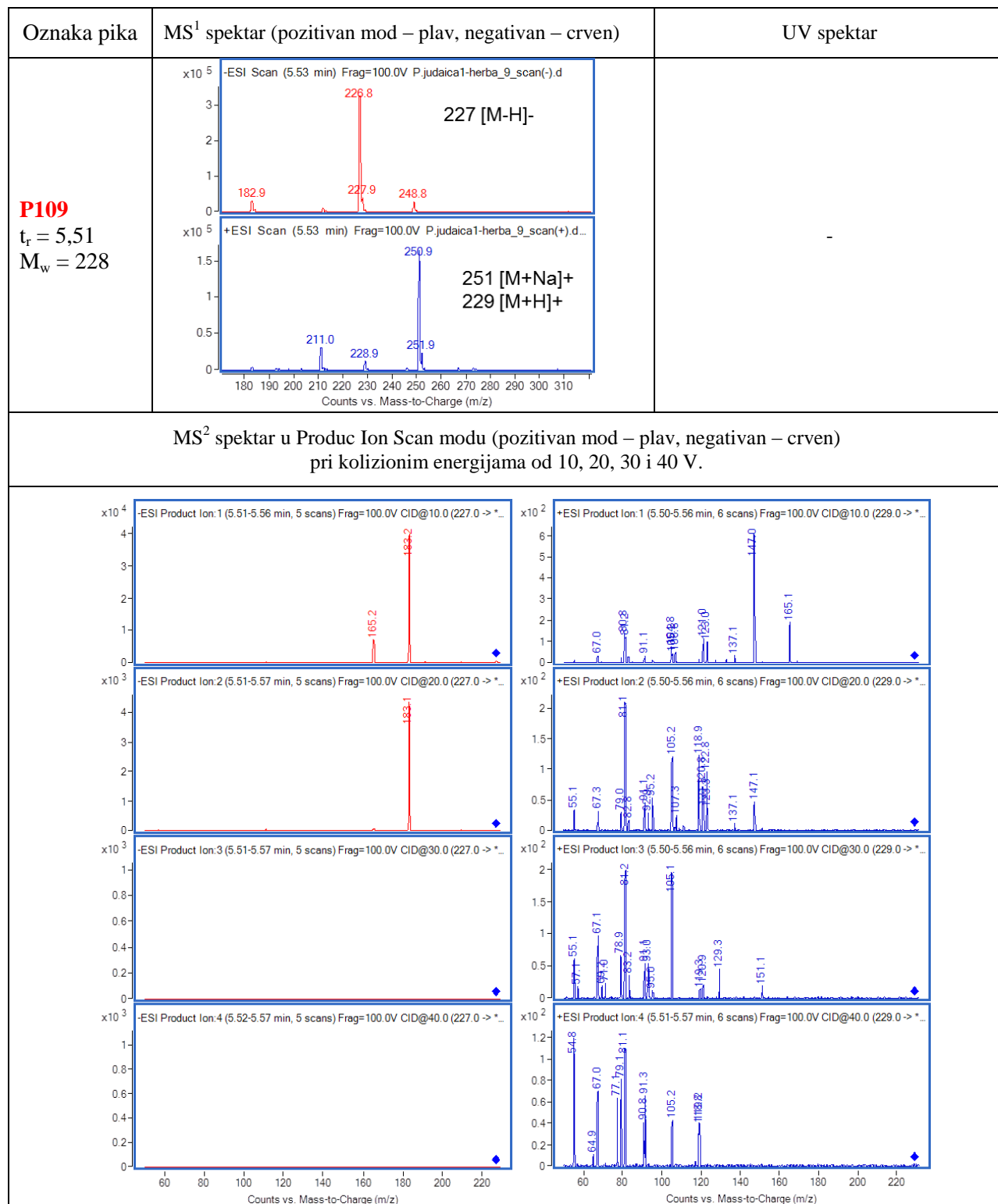
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P104 $t_r = 5,11$ $M_w = 424$</p>	 <p>+ESI Scan (5.11 min) Frag=100.0V P.lusitanica-koren_18_scan(+)...</p> <p>441.9 446.9 447.9</p> <p>447 [M+Na]⁺ 442 [M+NH₄]⁺</p> <p>-ESI Scan (5.11 min) Frag=100.0V P.lusitanica-koren_18_scan(-)...</p> <p>458.7 468.8 536.6</p> <p>469 [M+HCOO]⁻ 459 [M+Cl]⁻</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	-
<p>MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.</p>		
-		

Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P105 $t_r = 5,18$ $M_w = 216$</p>		-
<p>MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.</p>		
		

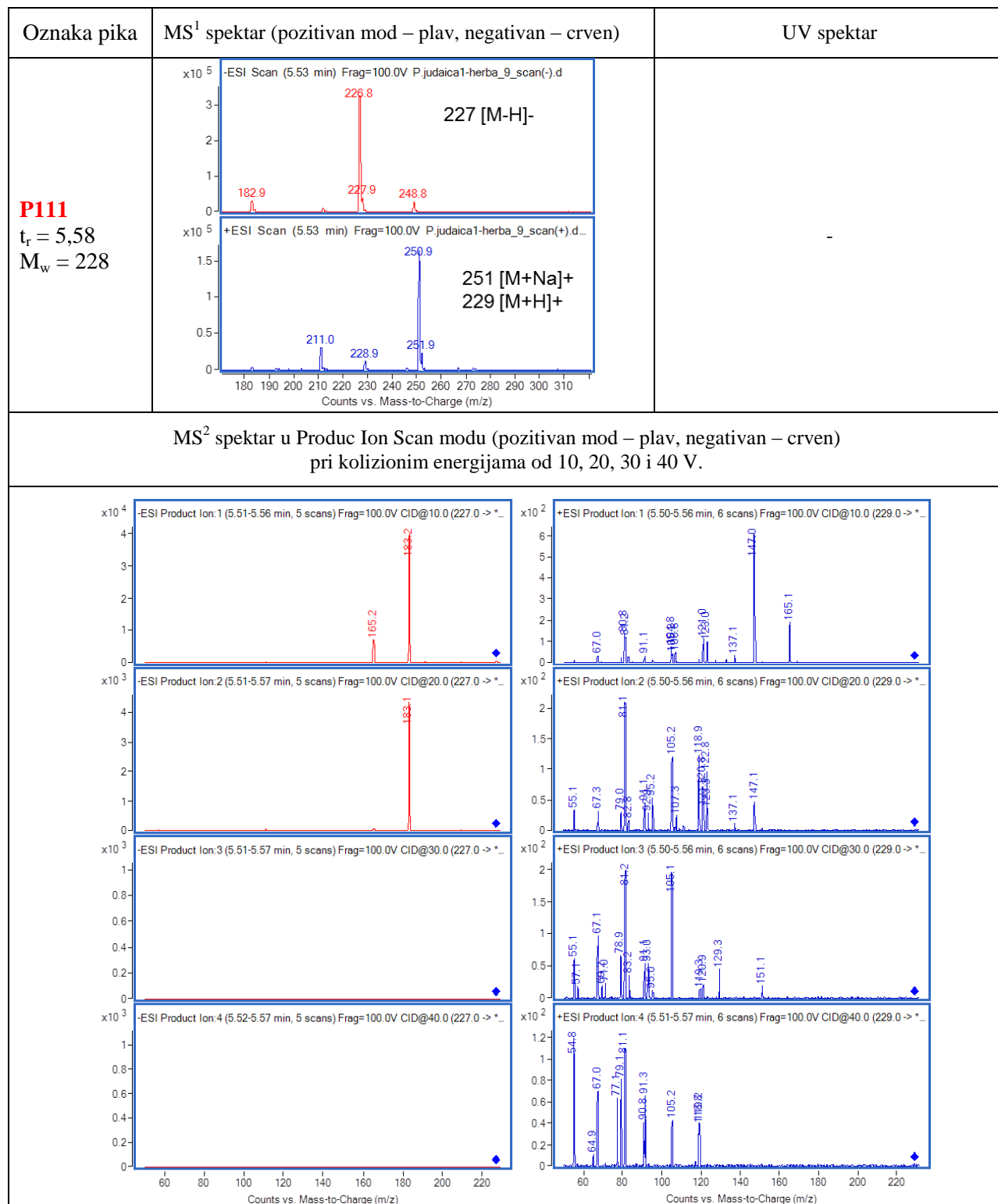
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P106 $t_r = 5,20$ $M_w = 424$		-
MS ² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		
-		

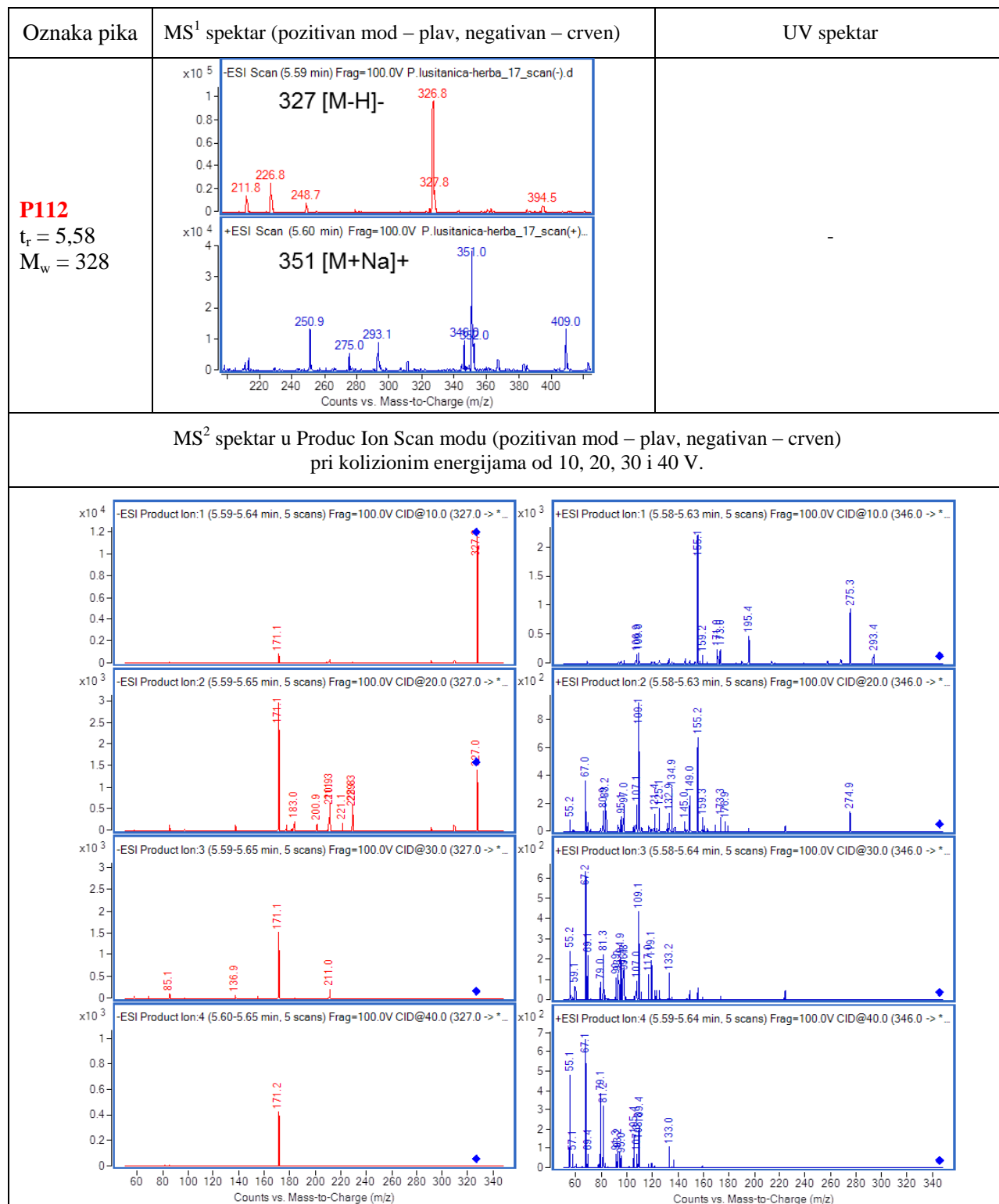
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P107 $t_r = 5,30$ $M_w = 562$		-
MS ² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		
-		

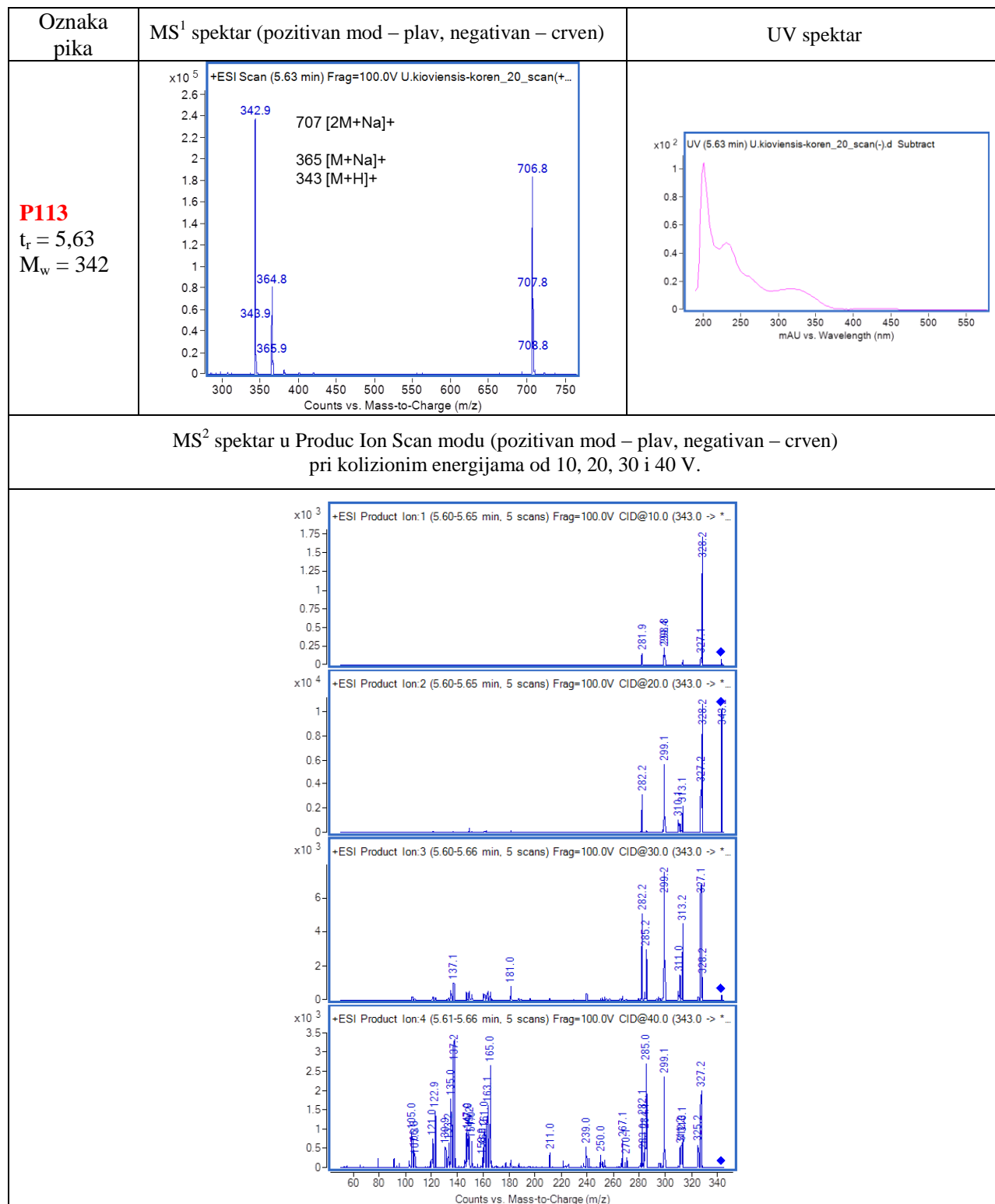
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P108 $t_r = 5,44$ $M_w = 400$</p>		-
<p>MS² spektar u Product Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.</p>		

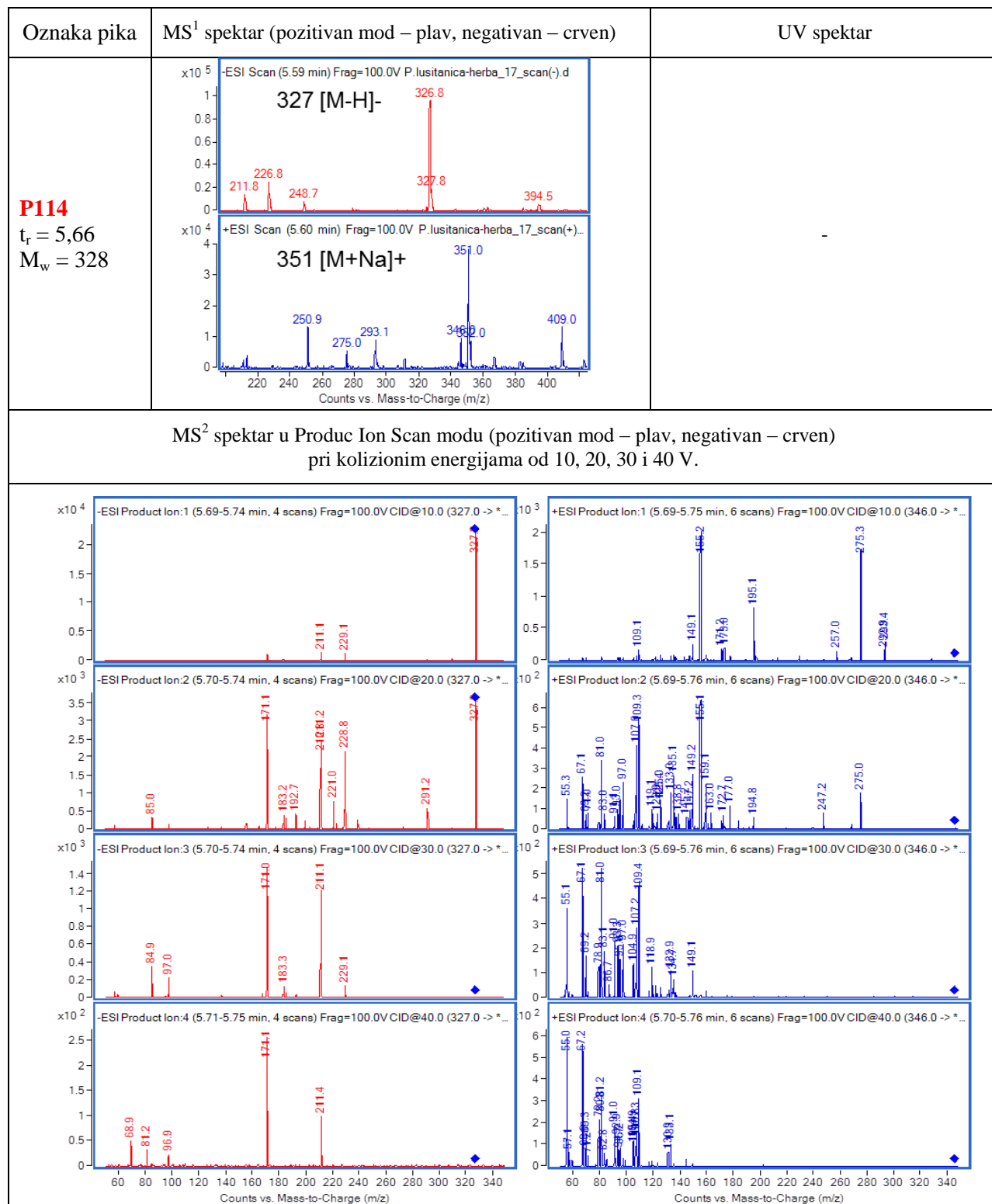


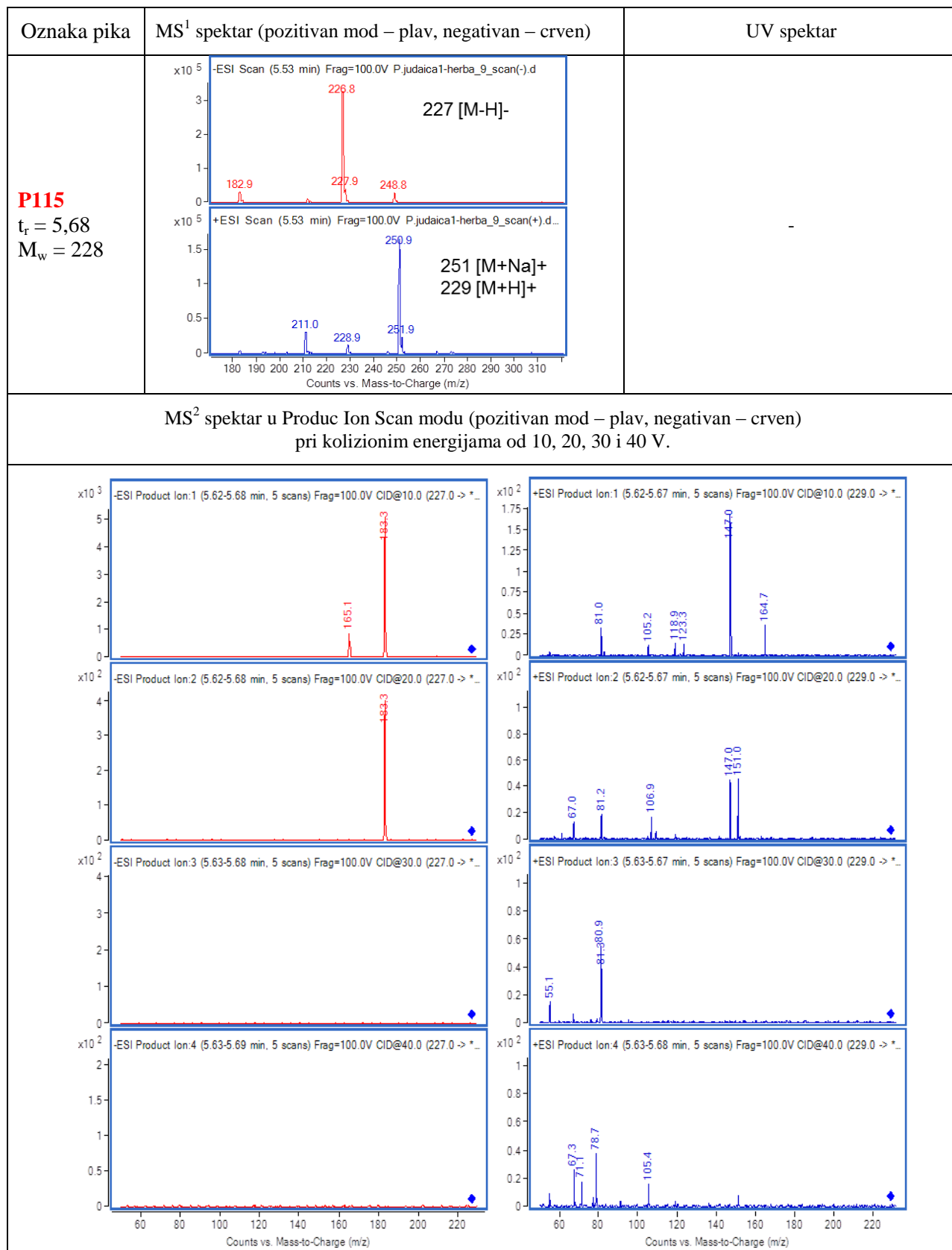
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P110 $t_r = 5,51$ $M_w = 250$</p>		-
<p>MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.</p>		
-		





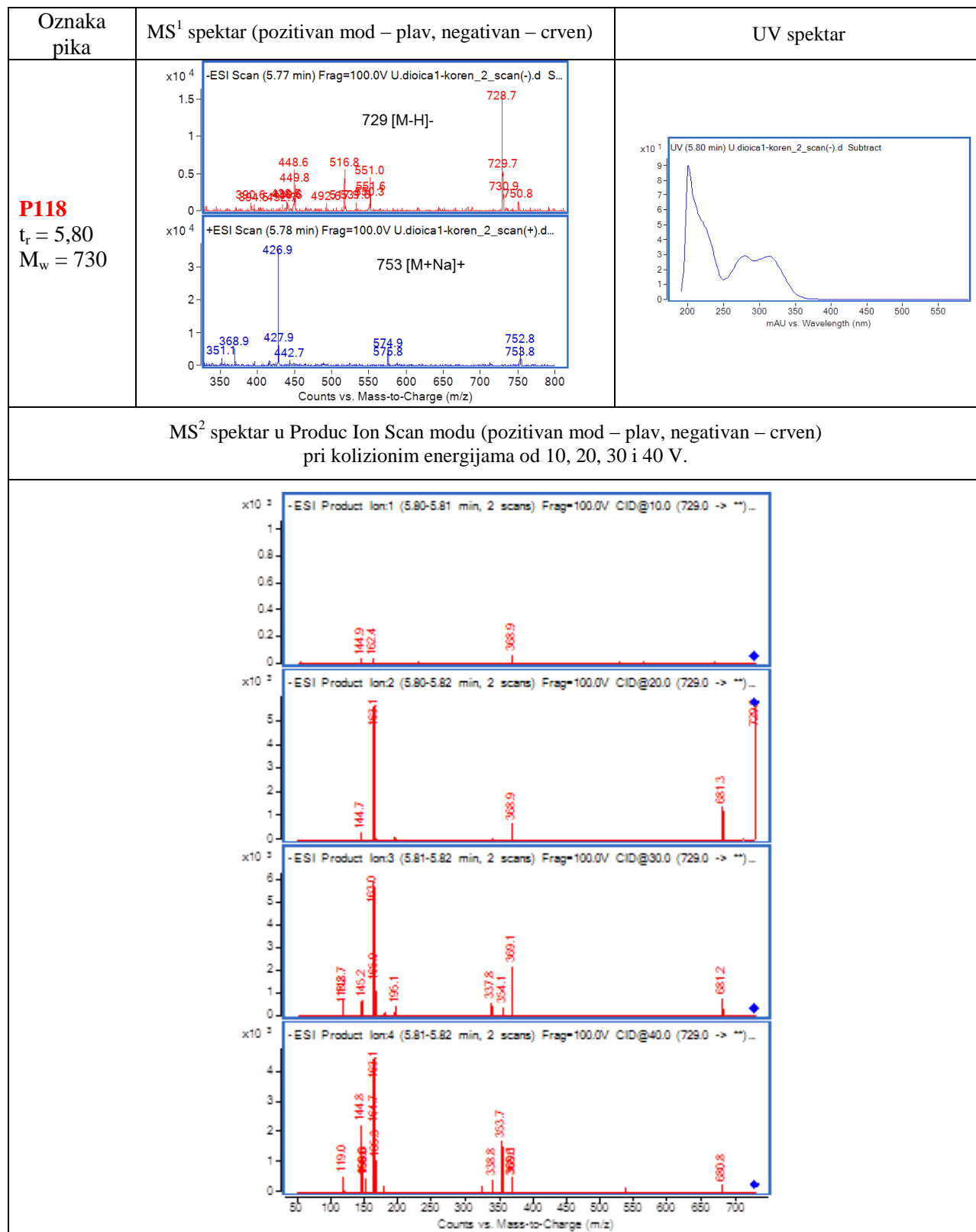


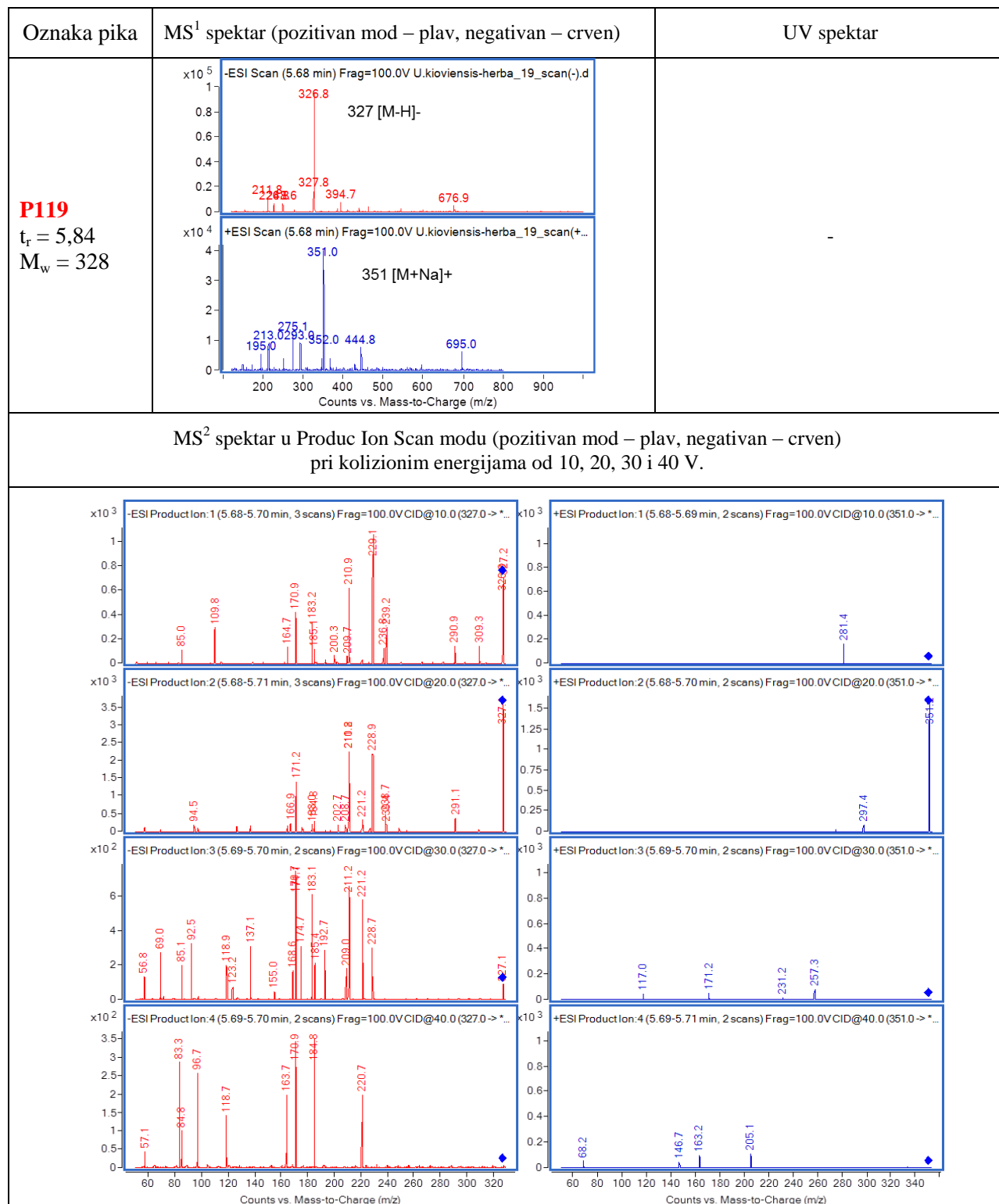


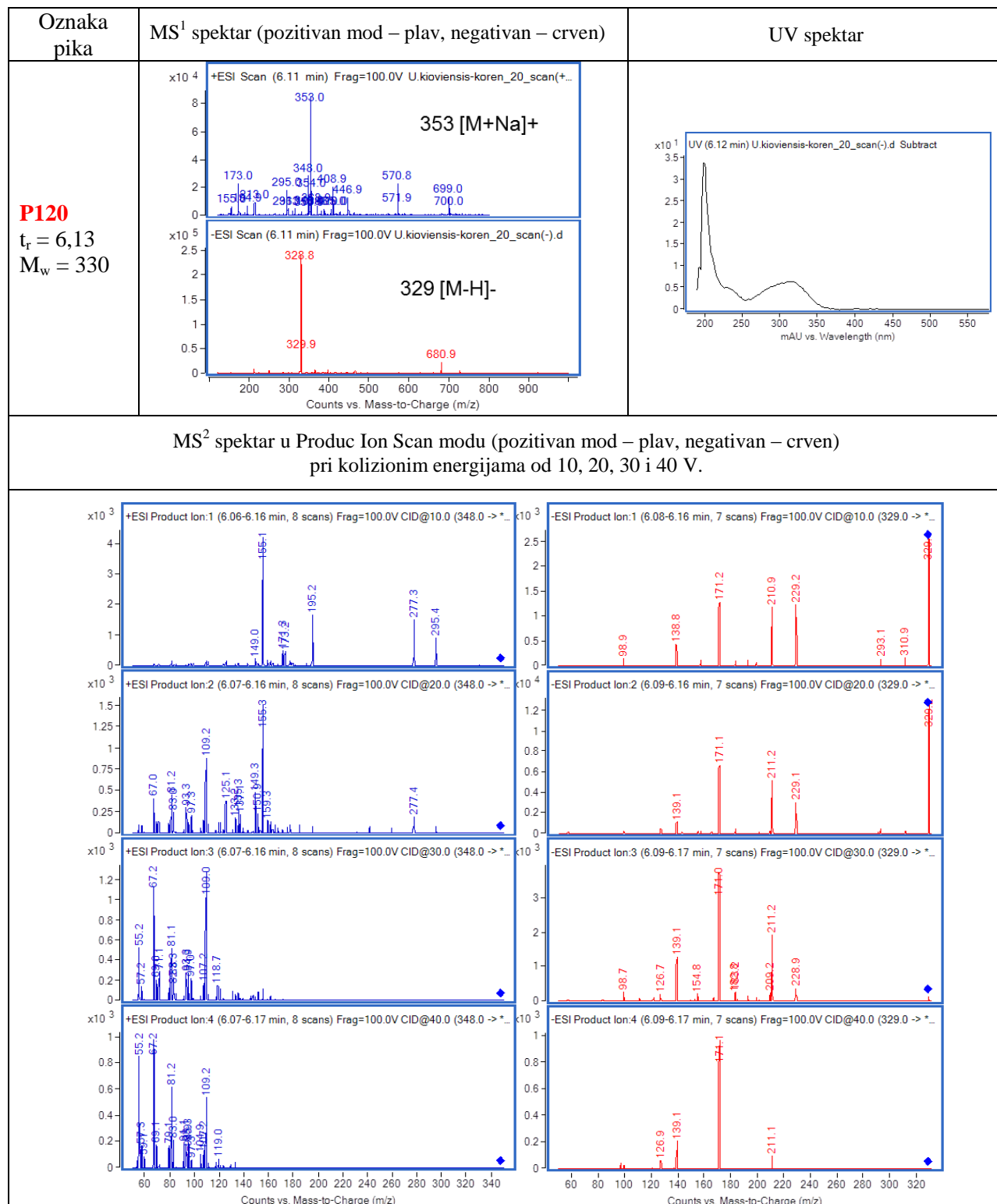


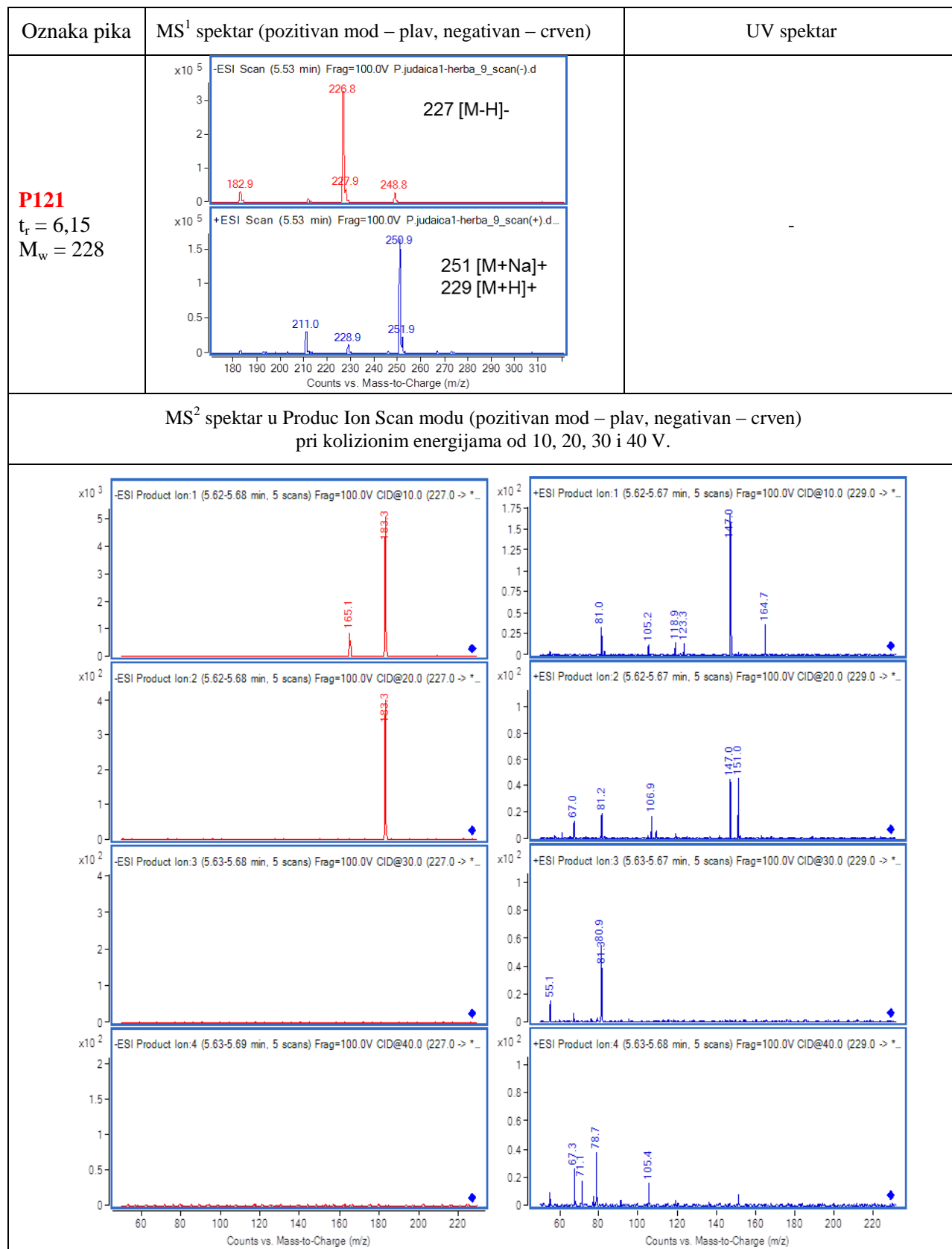
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P116 $t_r = 5,68$ $M_w = 404$		-
MS ² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		
-		

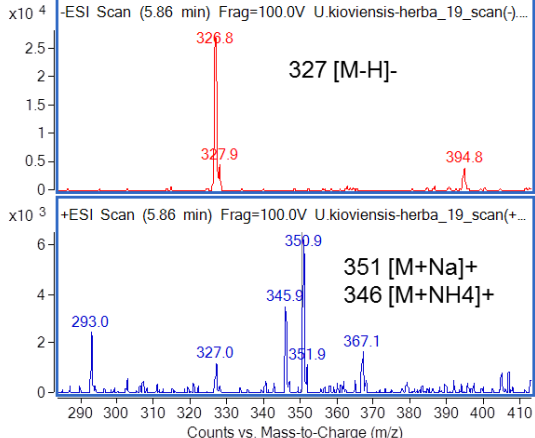
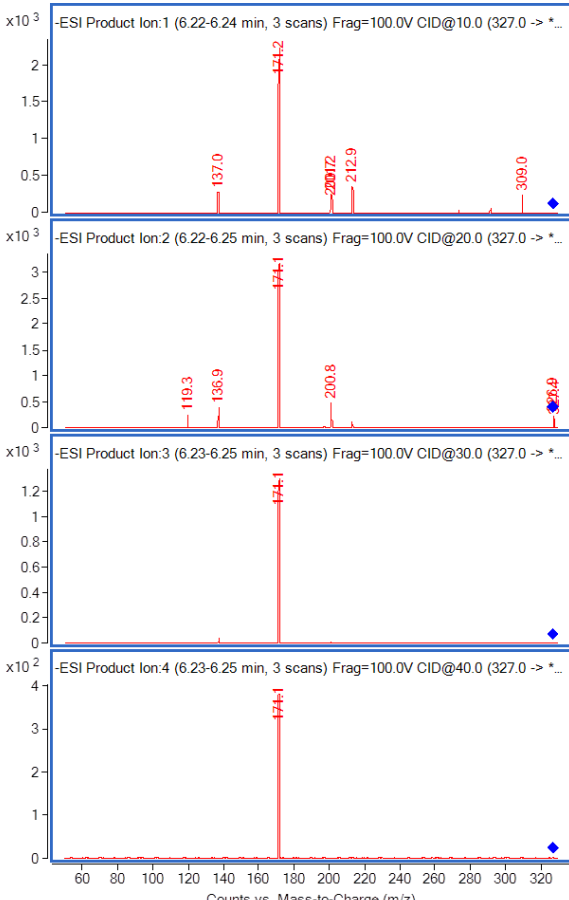
Oznaka pika	
P117 $t_r = 5,72$ $M_w = 328$	Isti MS ¹ i MS ² spektri kao P112 i P114

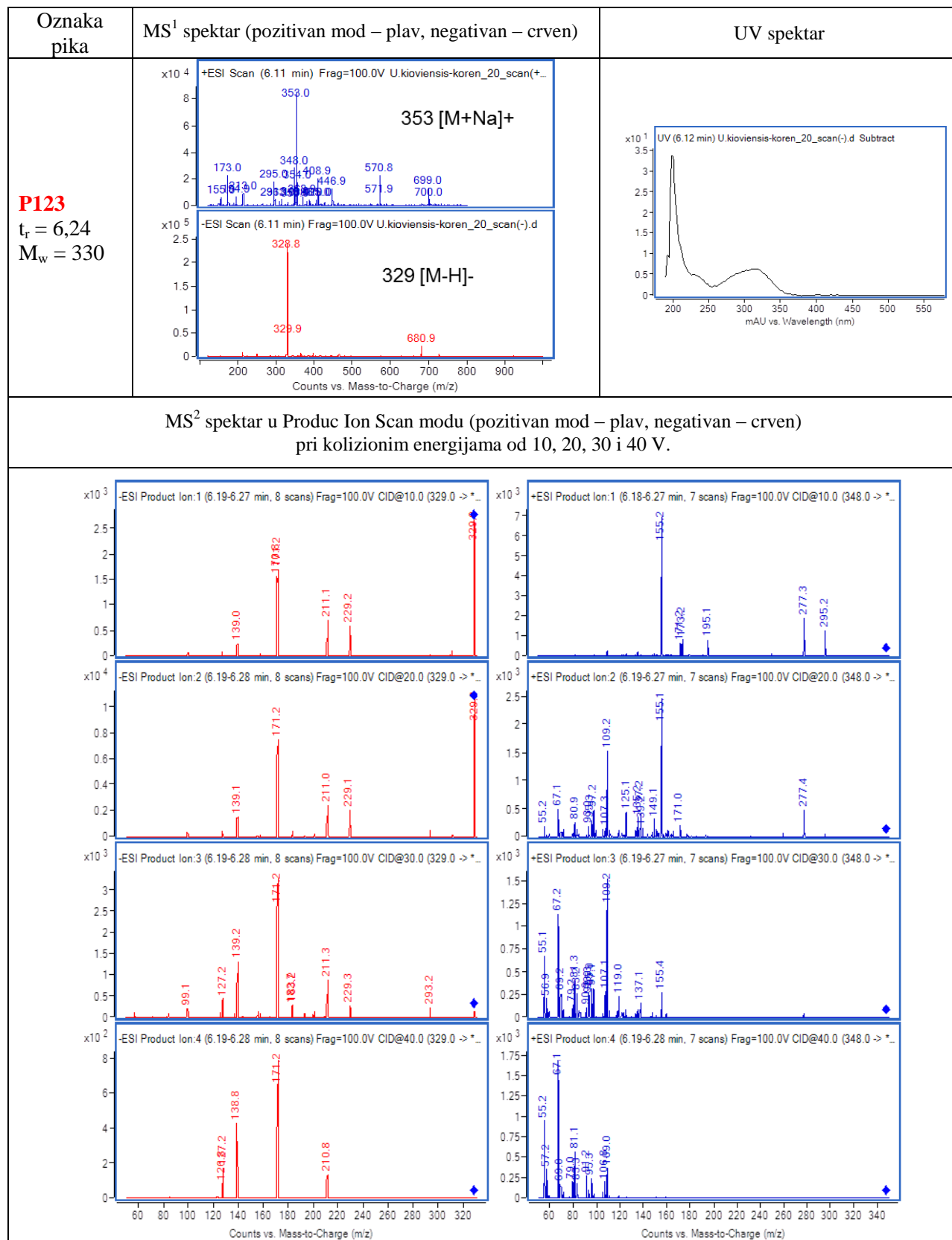


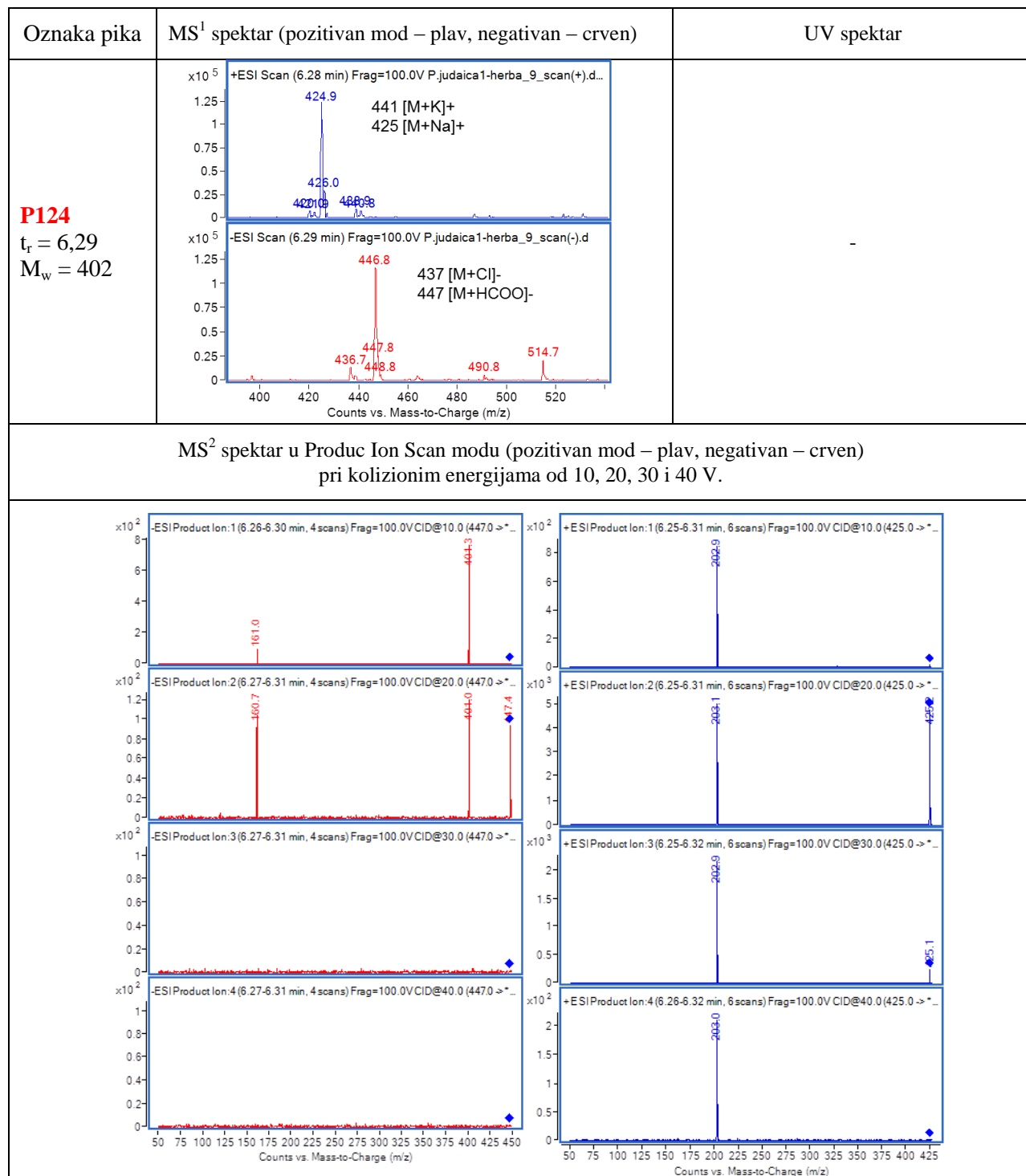


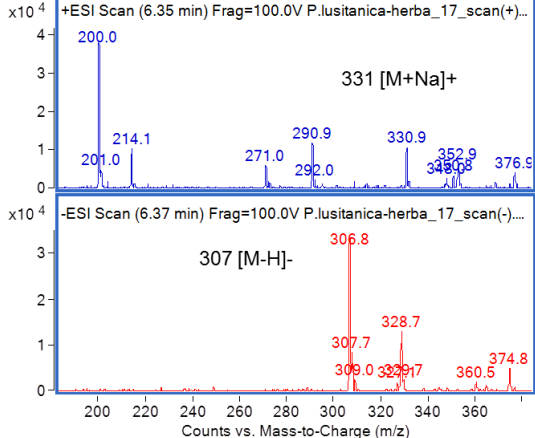


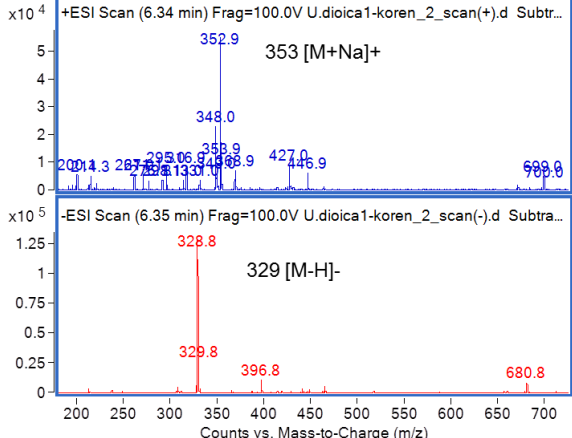
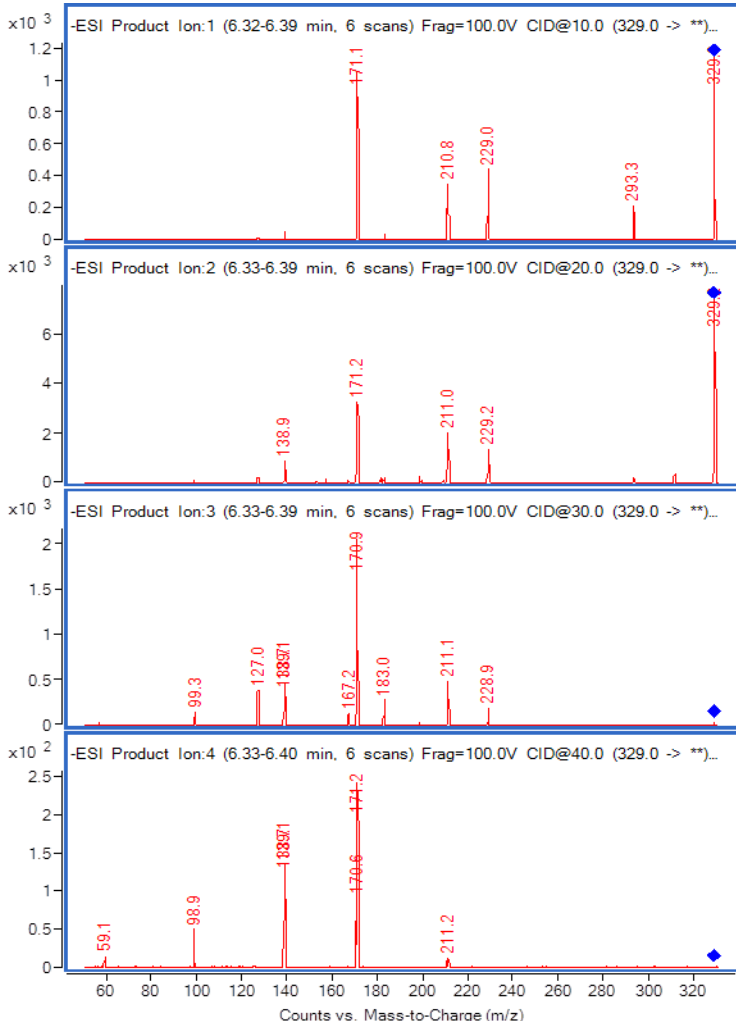


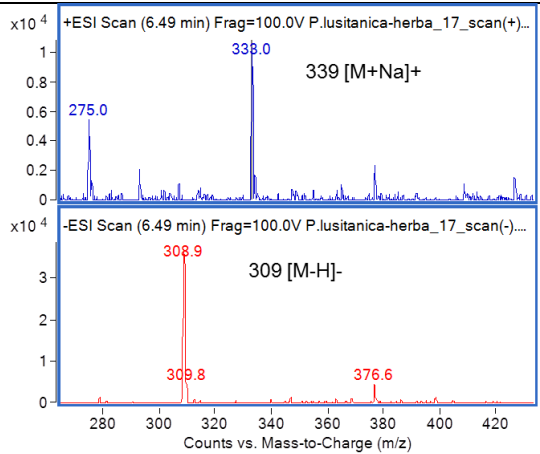
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P122 $t_r = 6,22$ $M_w = 328$</p>	 <p>-ESI Scan (5.86 min) Frag=100.0V U.kioviensis-herba_19_scan(-)...</p> <p>327 [M-H]⁻</p> <p>326.8, 327.9, 394.8</p> <p>+ESI Scan (5.86 min) Frag=100.0V U.kioviensis-herba_19_scan(+)</p> <p>351 [M+Na]⁺ 346 [M+NH₄]⁺</p> <p>293.0, 327.0, 345.9, 350.9, 351.9, 367.1</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	-
<p>MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.</p>		
 <p>-ESI Product Ion:1 (6.22-6.24 min, 3 scans) Frag=100.0V CID@10.0 (327.0 -> *...)</p> <p>137.0, 174.2, 200.72, 212.9, 309.0</p> <p>-ESI Product Ion:2 (6.22-6.25 min, 3 scans) Frag=100.0V CID@20.0 (327.0 -> *...)</p> <p>119.3, 136.9, 174.1, 200.8, 326.9</p> <p>-ESI Product Ion:3 (6.23-6.25 min, 3 scans) Frag=100.0V CID@30.0 (327.0 -> *...)</p> <p>174.1</p> <p>-ESI Product Ion:4 (6.23-6.25 min, 3 scans) Frag=100.0V CID@40.0 (327.0 -> *...)</p> <p>174.1</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>		





Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P125 $t_r = 6,35$ $M_w = 308$</p>	 <p>+ESI Scan (6.35 min) Frag=100.0V P.lusitanica-herba_17_scan(+)... x10⁴ 4 3 2 1 0 200.0 214.1 290.9 330.9 352.9 376.9 201.0 271.0 292.0 331 [M+Na]+ Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p> <p>-ESI Scan (6.37 min) Frag=100.0V P.lusitanica-herba_17_scan(-)... x10⁴ 3 2 1 0 306.8 307 [M-H]- 307.7 309.0 328.7 332.7 360.5 374.8 Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	-
<p>MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.</p>		

Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P126 $t_r = 6,35$ $M_w = 330$</p>		-
<p>MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.</p>		
		

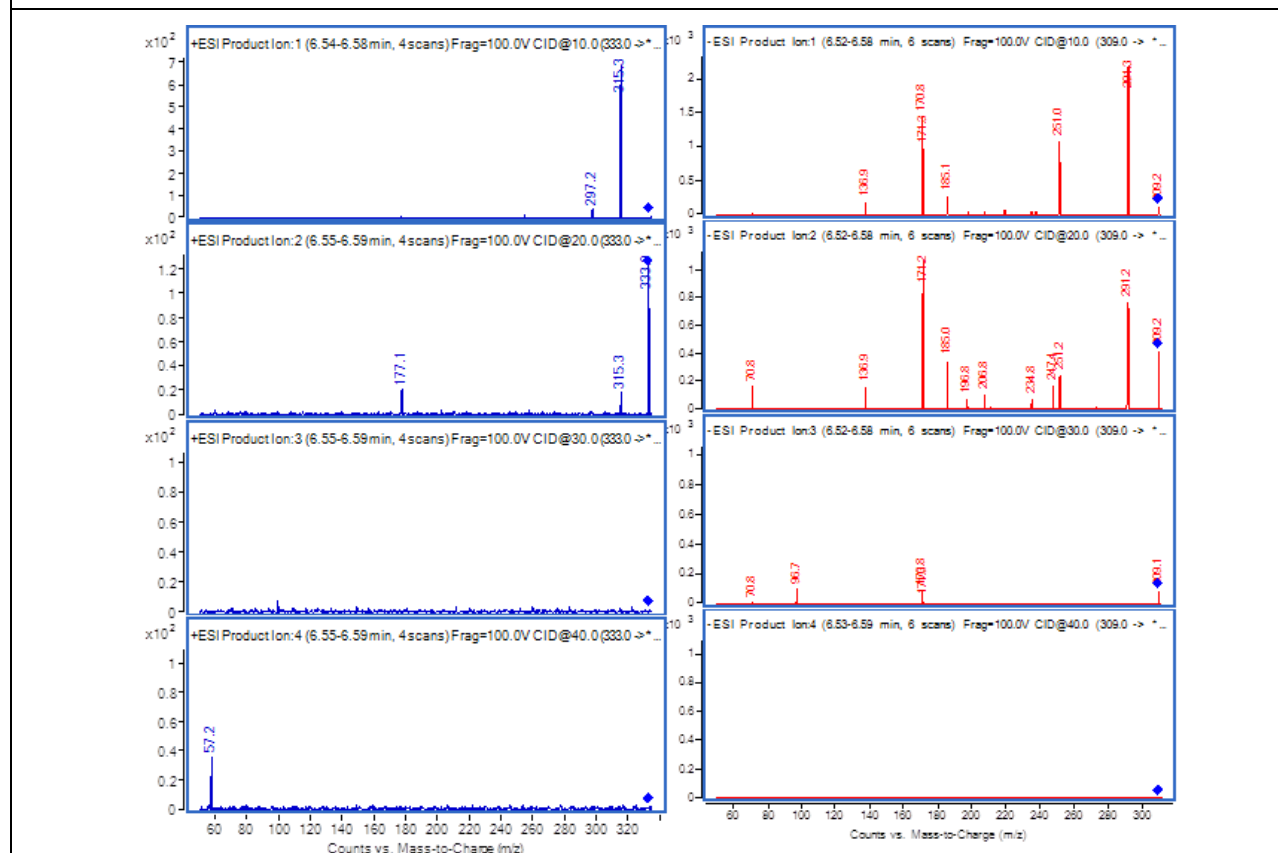
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P127 $t_r = 6,49$ $M_w = 310$	 <p>+ESI Scan (6.49 min) Frag=100.0V P.lusitanica-herba_17_scan(+)... 339.0 339 [M+Na]⁺ 275.0</p> <p>-ESI Scan (6.49 min) Frag=100.0V P.lusitanica-herba_17_scan(-)... 309.9 309 [M-H]⁻ 309.8 376.6</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	-
MS ² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		

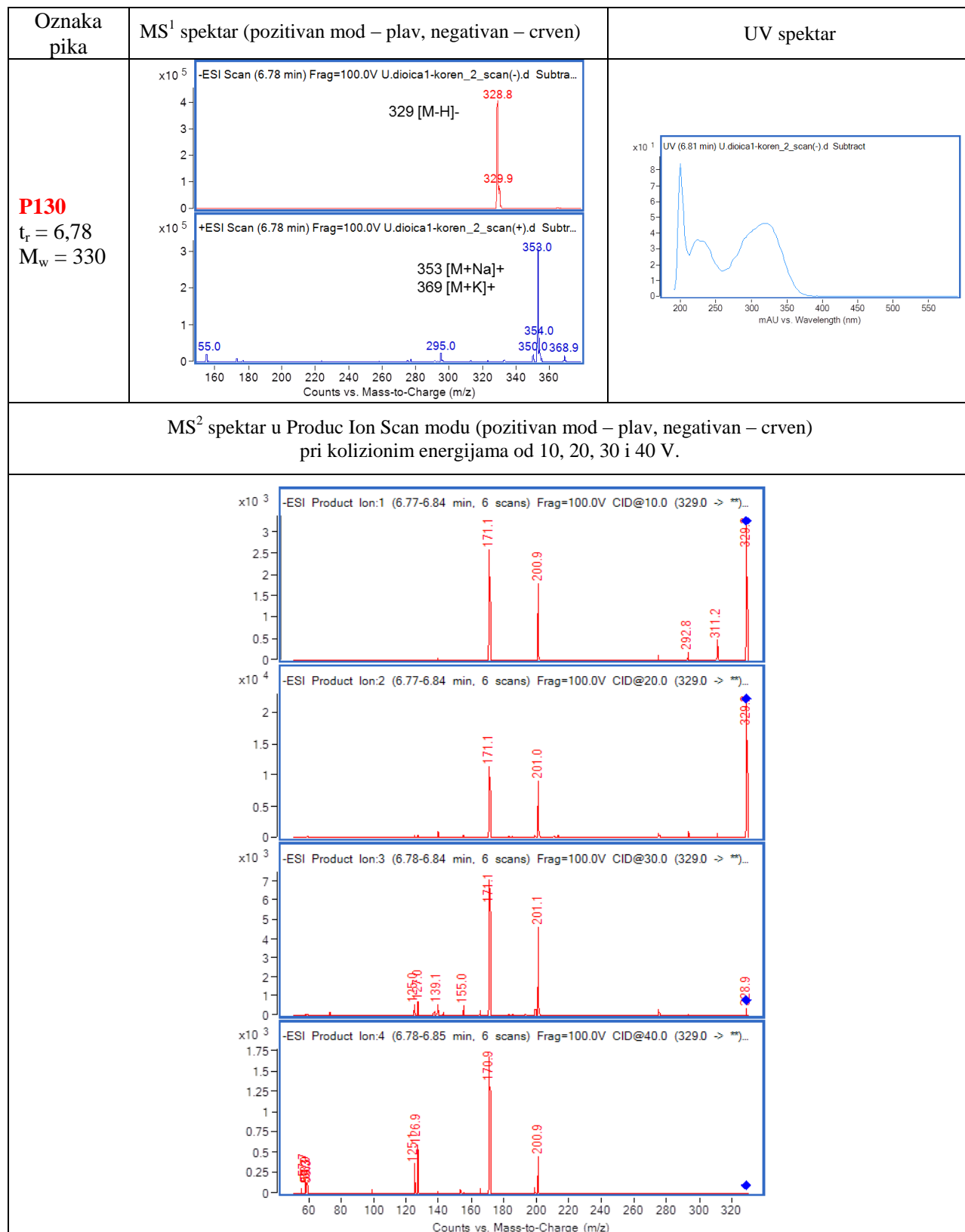
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P128 $t_r = 6,54$ $M_w = 310$		-

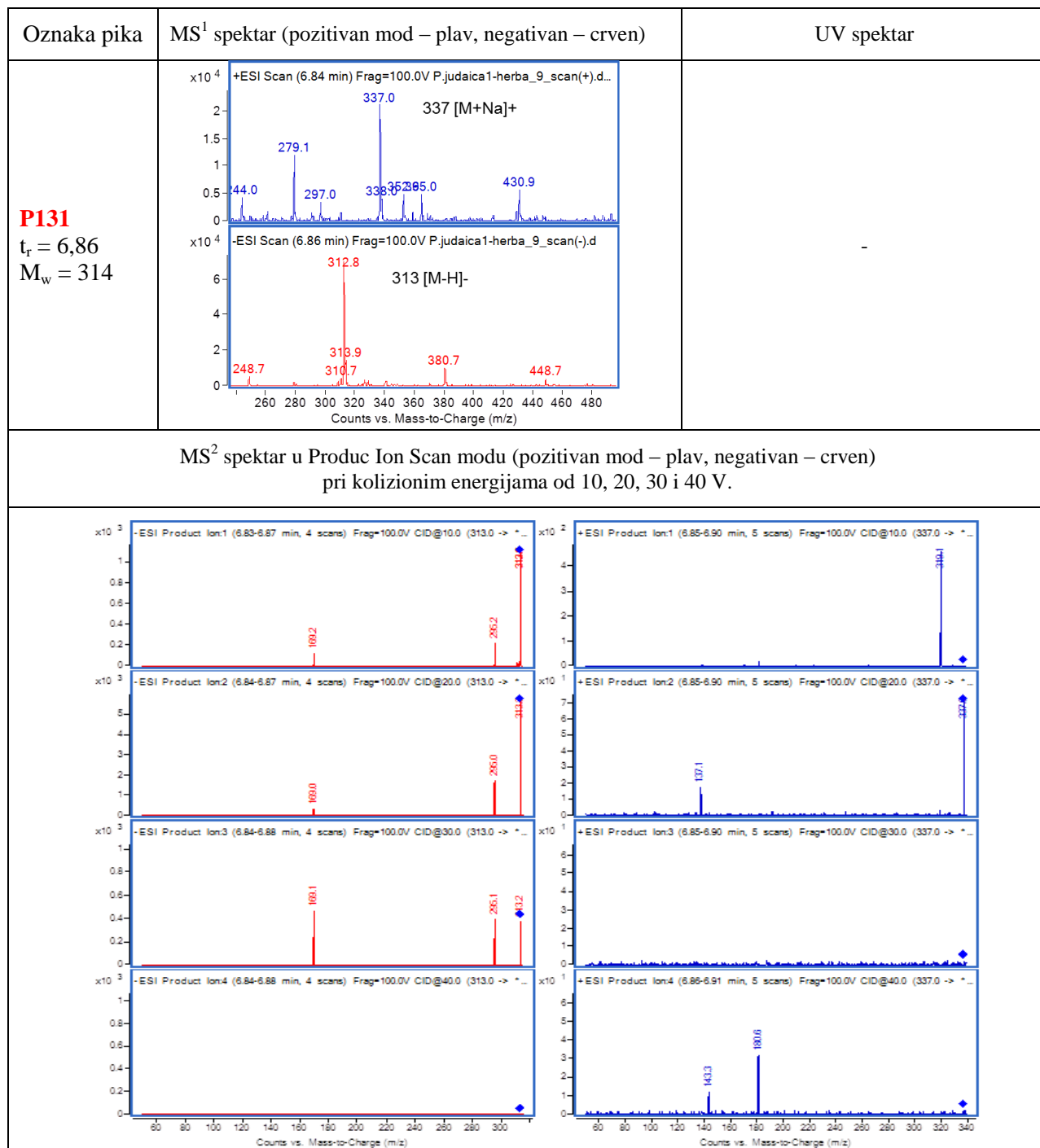
MS² spektar u Product Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven)
pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.

Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P129 $t_r = 6,72$ $M_w = 310$	<p>+ESI Scan (6.54 min) Frag=100.0V P.judaica1-herba_9_scan(+).d... 333 [M+Na]⁺</p> <p>-ESI Scan (6.55 min) Frag=100.0V P.judaica1-herba_9_scan(-).d 309 [M-H]⁻</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	-

MS² spektar u Product Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven)
 pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.



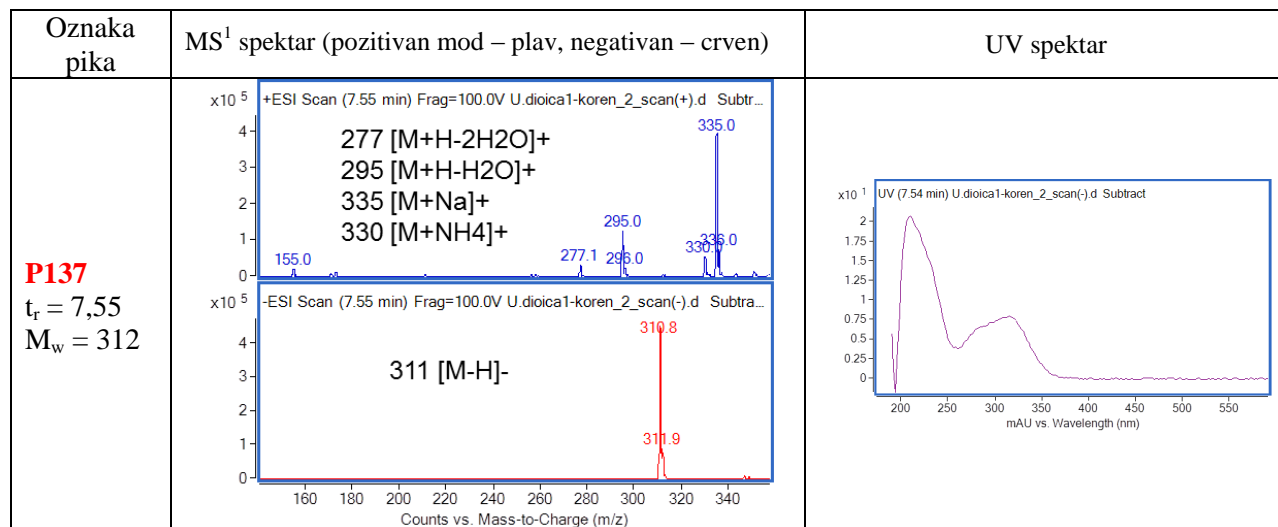




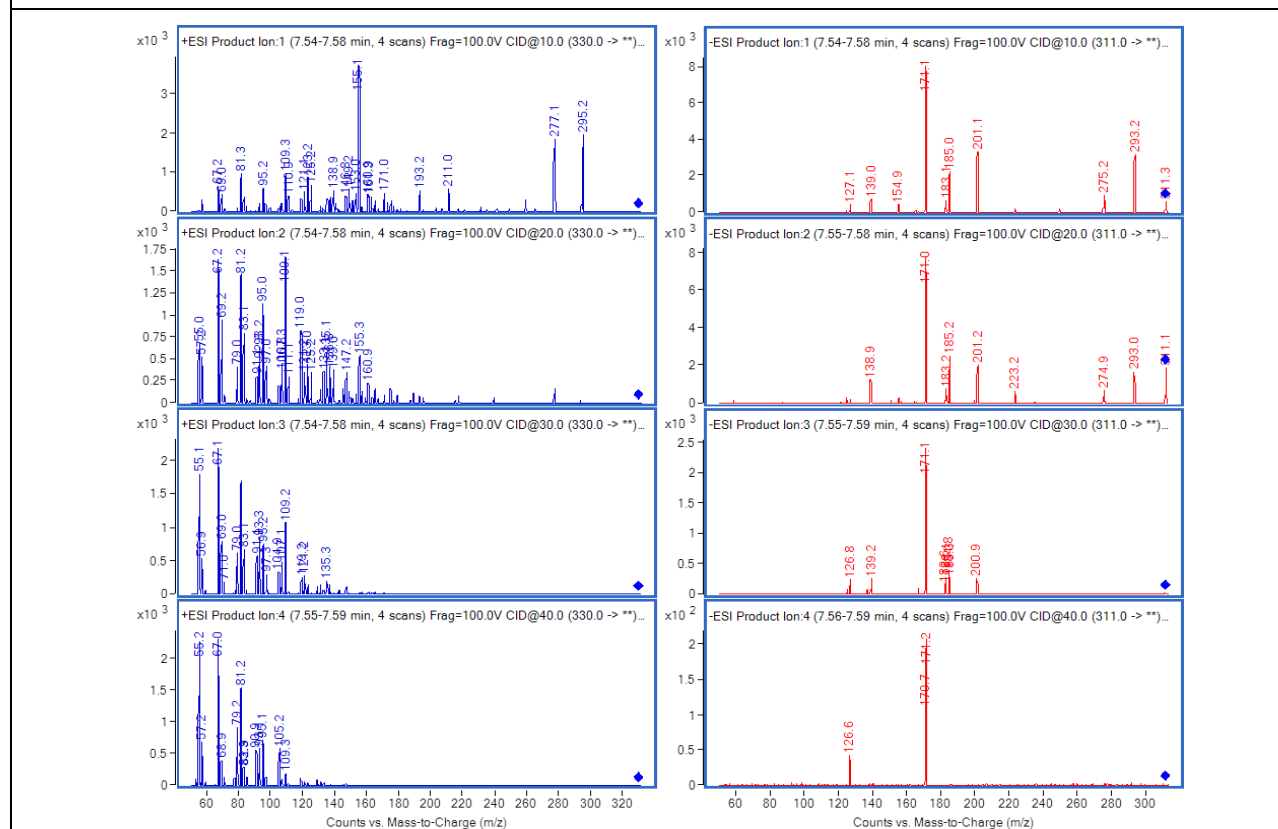
Oznaka pika	
P132 $t_r = 7,07$ $M_w = 330$	Isti UV, MS ¹ i MS ² spektri kao P130

Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P133 $t_r = 7,12$ $M_w = 286$	<p>+ESI Scan (7.11 min) Frag=100.0V P.lusitanica-koren_18_scan(+)... 309 [M+Na]⁺ 251.1 269.0 309.9 367.1 402.9</p> <p>-ESI Scan (7.12 min) Frag=100.0V P.lusitanica-koren_18_scan(-)... 285 [M-H]⁻ 284.9 285.9 342.7 352.9 420.6</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	-
MS ² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		
-		

Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P134 $t_r = 7,35$ $M_w = 310$	<p>MS¹ spectra for P134. The top plot shows the negative ion scan with a base peak at m/z 309.8 and another significant peak at 376.7. The bottom plot shows the positive ion scan with a base peak at m/z 332.9 and other peaks at 275.0 and 328.0.</p>	-
MS ² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		
	<p>MS² spectra for P134 at collision energies of 10, 20, 30, and 40 V. Each row shows a negative ion scan (left) and a positive ion scan (right). The negative ion scans show characteristic fragment ions, and the positive ion scans show the corresponding fragment ions from the [M+Na]⁺ precursor.</p>	
P135 $t_r = 7,42$ $M_w = 310$	P136 $t_r = 7,45$ $M_w = 310$	- imaju iste MS1 i MS2 spektre kao P134



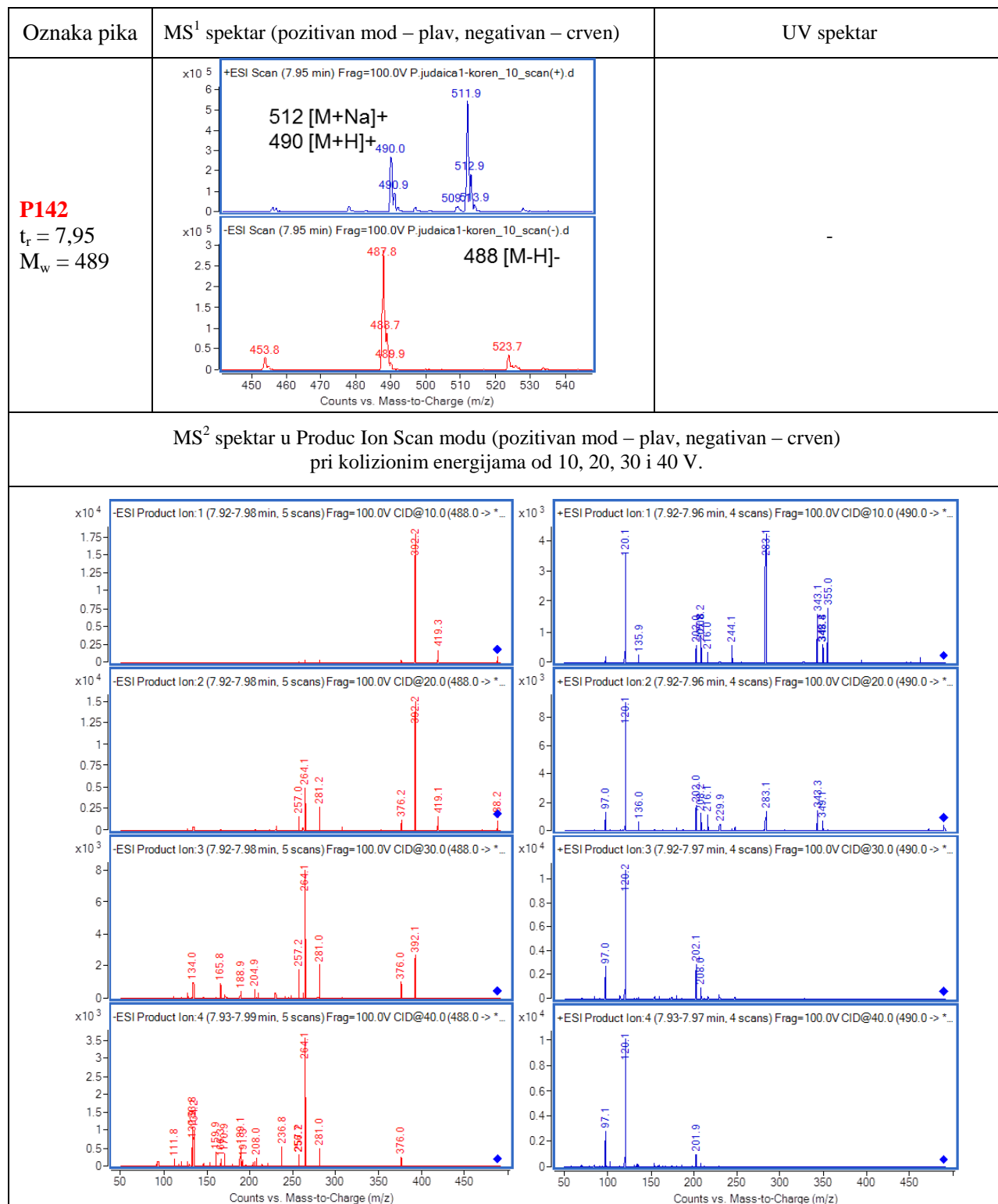
MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.



Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P138 $t_r = 7,69$ $M_w = 523$		-

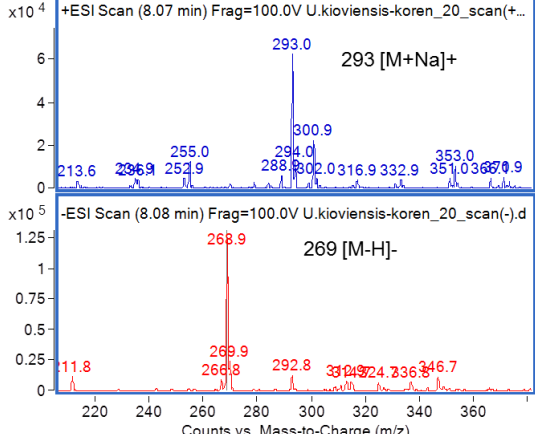
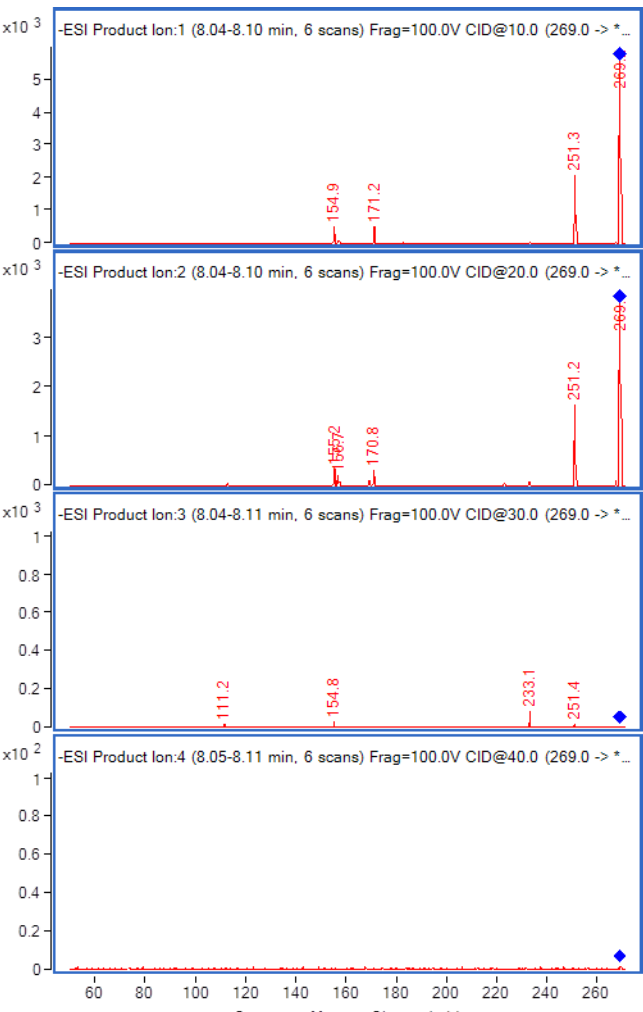
MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven)
pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.

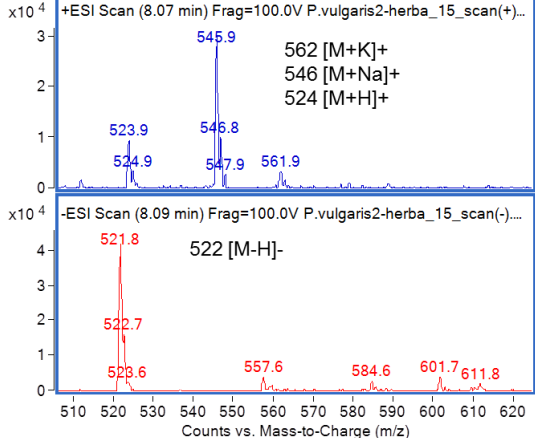
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P141 $t_r = 7,92$ $M_w = 314$</p>	<p>+ESI Scan (7.91 min) Frag=100.0V U.dioica1-koren_2_scan(+).d Subtra... x10⁴ 337 [M+Na]⁺ 362.0 336.9 322.0 315.0 338.0 363.0 279.0 296.9 430.8</p> <p>-ESI Scan (7.91 min) Frag=100.0V U.dioica1-koren_2_scan(-).d Subtra... x10⁵ 313 [M-H]⁻ 312.9 313.9 370.8 383.8 384.8</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	-
<p>MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.</p>		
<p>-ESI Product Ion:1 (7.90-7.94 min, 5 scans) Frag=100.0V CID@10.0 (313.0 -> **)... x10³ 171.0 204.0 295.3</p> <p>-ESI Product Ion:2 (7.90-7.95 min, 5 scans) Frag=100.0V CID@20.0 (313.0 -> **)... x10³ 170.7 204.8 277.3 295.2</p> <p>-ESI Product Ion:3 (7.90-7.95 min, 5 scans) Frag=100.0V CID@30.0 (313.0 -> **)... x10³ 127.2 164.8 170.7 204.0</p> <p>-ESI Product Ion:4 (7.90-7.95 min, 5 scans) Frag=100.0V CID@40.0 (313.0 -> **)... x10² 56.2 75.2 126.7 171.0</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>		

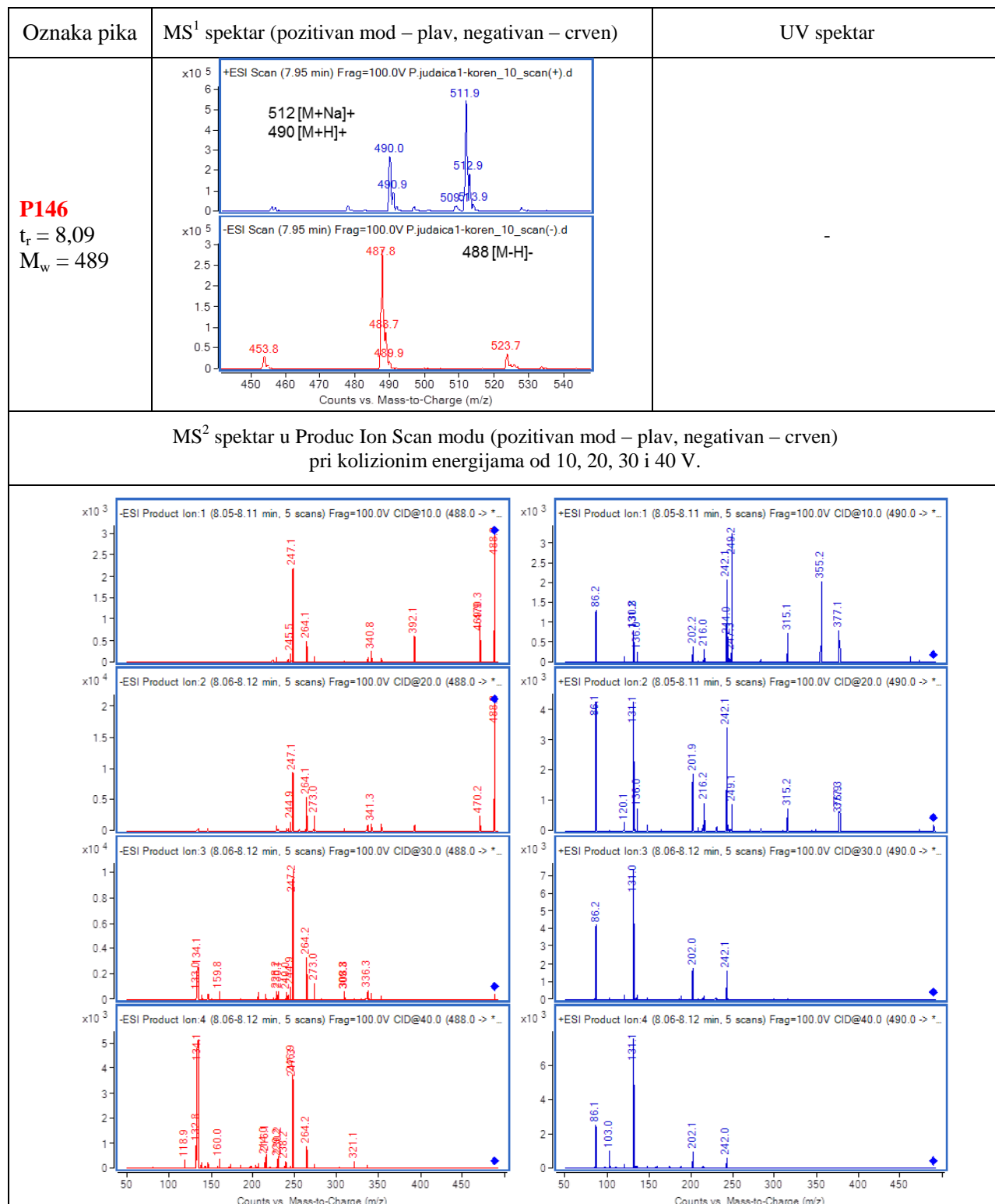


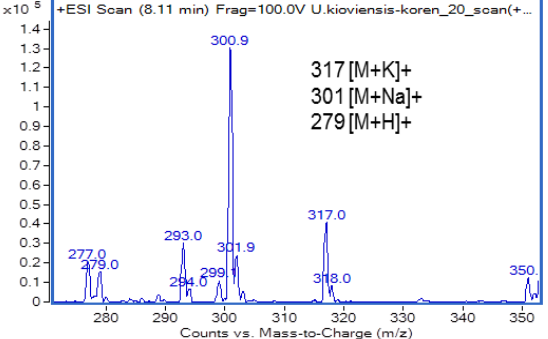
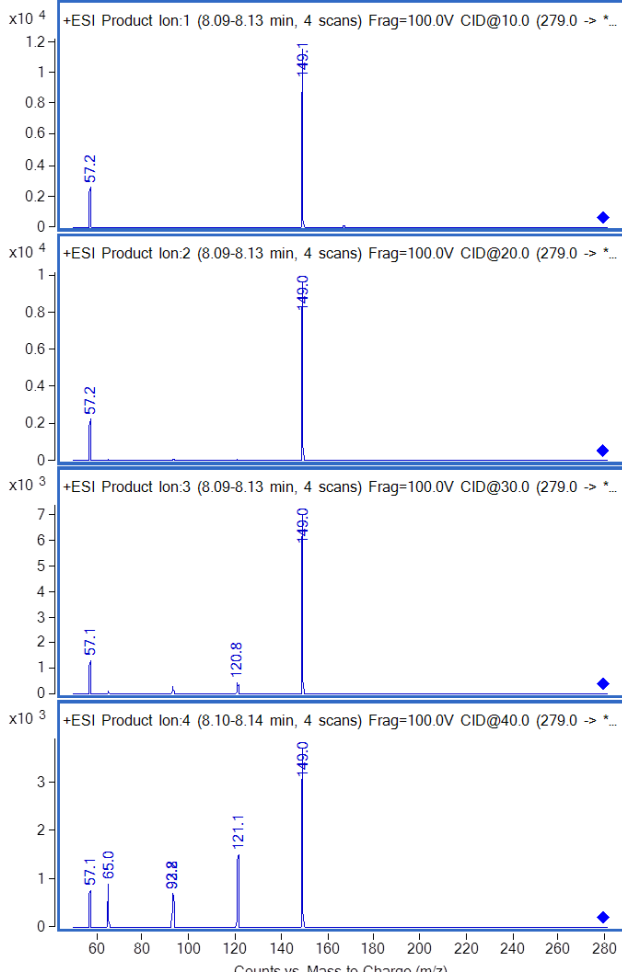
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P143 $t_r = 7,97$ $M_w = 455$		-

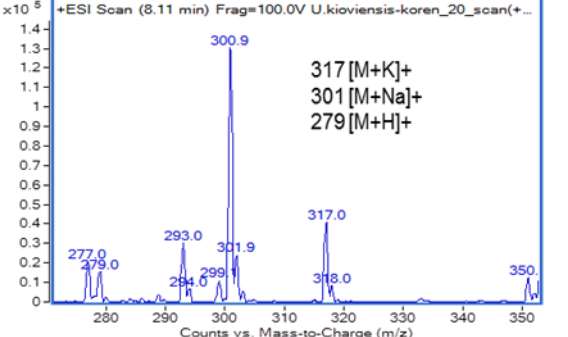
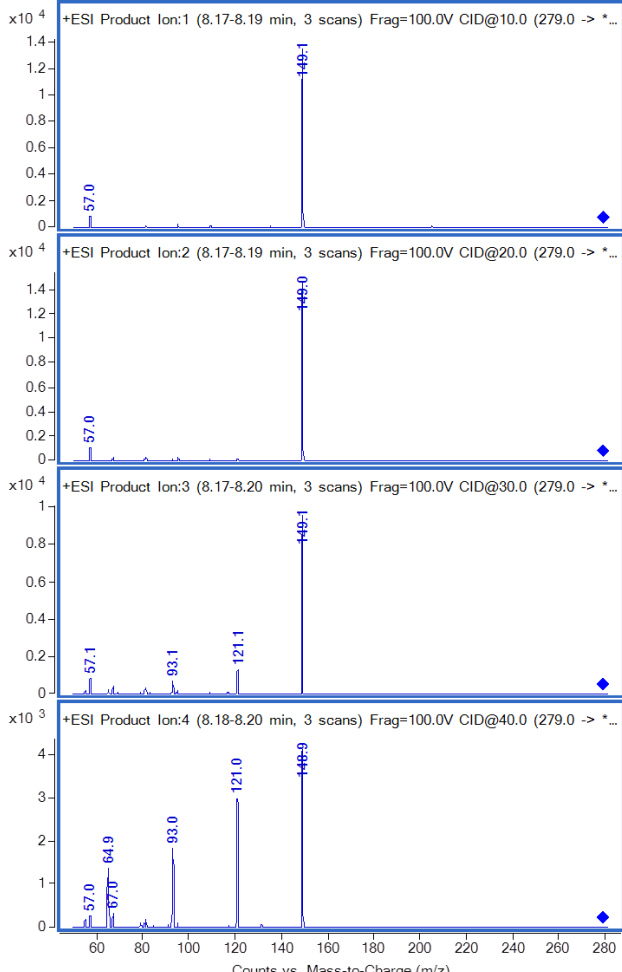
MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven)
pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.

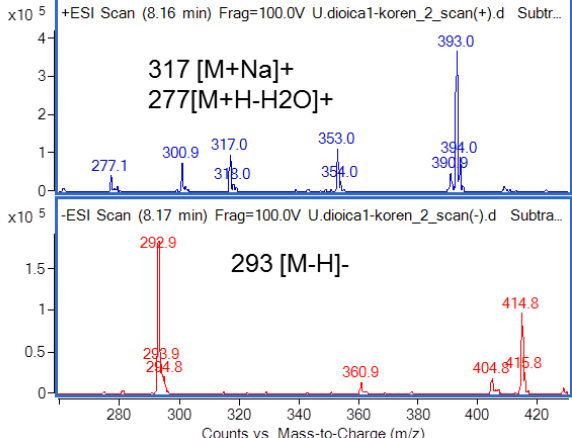
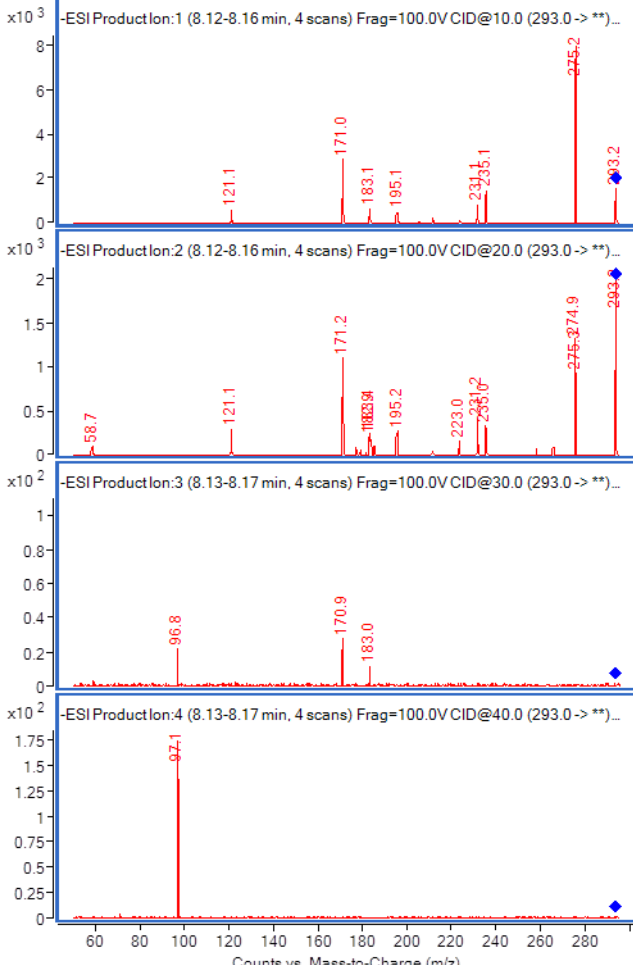
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P144 $t_r = 8,07$ $M_w = 270$</p>	 <p>MS¹ spectra showing relative intensity versus m/z. The top plot (blue) is the positive ion scan (+ESI Scan) with a base peak at 293.0 [M+Na]+. The bottom plot (red) is the negative ion scan (-ESI Scan) with a base peak at 269.9 [M-H]-.</p>	-
<p>MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.</p>		
 <p>MS² spectra showing relative intensity versus m/z for different collision energies (CID@10.0, CID@20.0, CID@30.0, CID@40.0). The base peak is at 269.9 [M-H]- in all cases.</p>		

Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P145 $t_r = 8,09$ $M_w = 523$</p>		-
<p>MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.</p>		



Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P147 $t_r = 8,11$ $M_w = 278$</p>	 <p>+ESI Scan (8.11 min) Frag=100.0V U.kioviensis-koren_20_scan(+... 317 [M+K]⁺ 301 [M+Na]⁺ 279 [M+H]⁺</p>	-
MS ² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		
 <p>+ESI Product Ion:1 (8.09-8.13 min, 4 scans) Frag=100.0V CID@10.0 (279.0 -> *... +ESI Product Ion:2 (8.09-8.13 min, 4 scans) Frag=100.0V CID@20.0 (279.0 -> *... +ESI Product Ion:3 (8.09-8.13 min, 4 scans) Frag=100.0V CID@30.0 (279.0 -> *... +ESI Product Ion:4 (8.10-8.14 min, 4 scans) Frag=100.0V CID@40.0 (279.0 -> *...</p>		

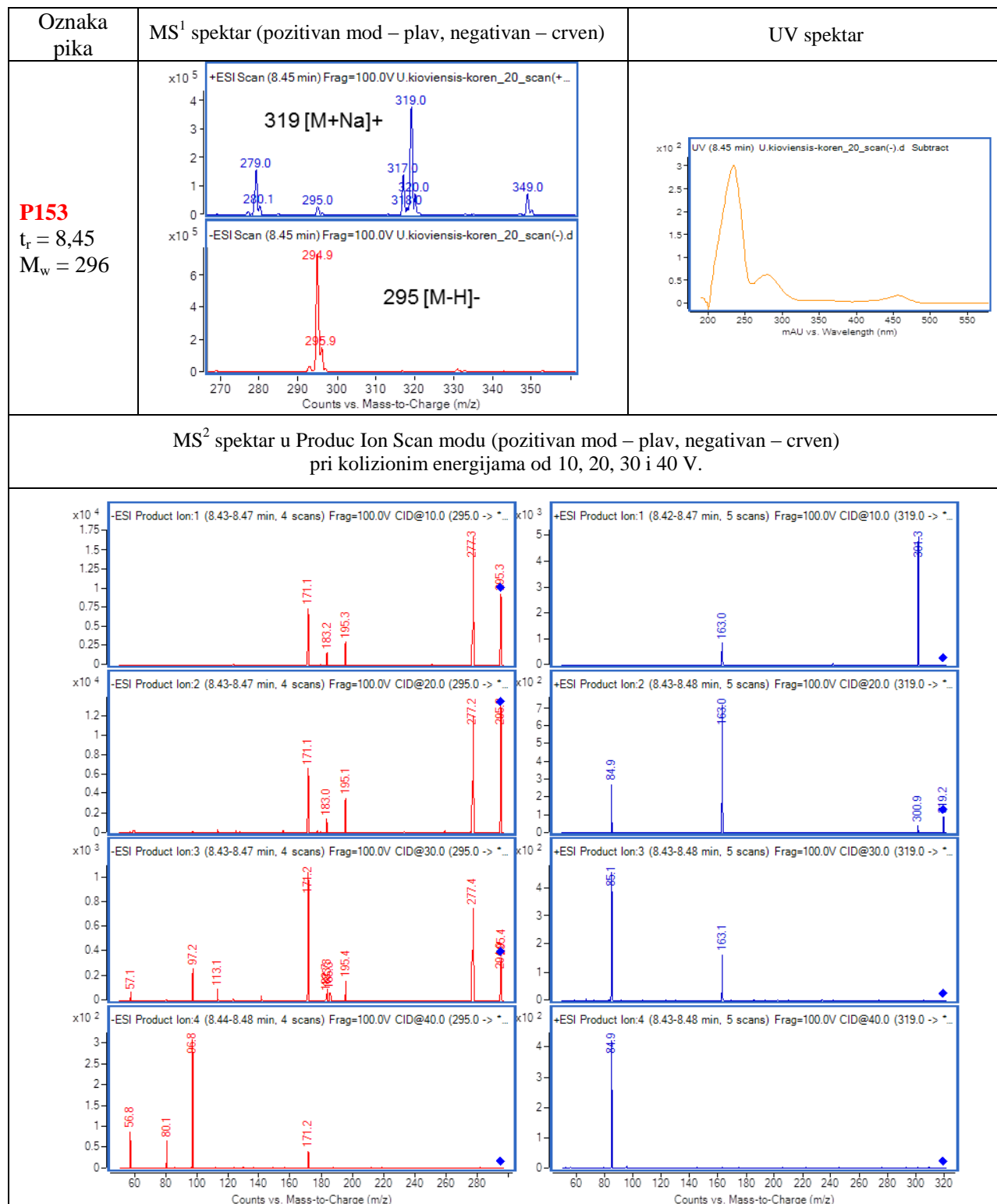
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P148 $t_r = 8,17$ $M_w = 278$</p>	 <p>+ESI Scan (8.11 min) Frag=100.0V U.kioviensis-koren_20_scan(+... 317 [M+K]⁺ 301 [M+Na]⁺ 279 [M+H]⁺</p>	-
<p>MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.</p>		
 <p>+ESI Product Ion:1 (8.17-8.19 min, 3 scans) Frag=100.0V CID@10.0 (279.0 -> *... +ESI Product Ion:2 (8.17-8.19 min, 3 scans) Frag=100.0V CID@20.0 (279.0 -> *... +ESI Product Ion:3 (8.17-8.20 min, 3 scans) Frag=100.0V CID@30.0 (279.0 -> *... +ESI Product Ion:4 (8.18-8.20 min, 3 scans) Frag=100.0V CID@40.0 (279.0 -> *...</p>		

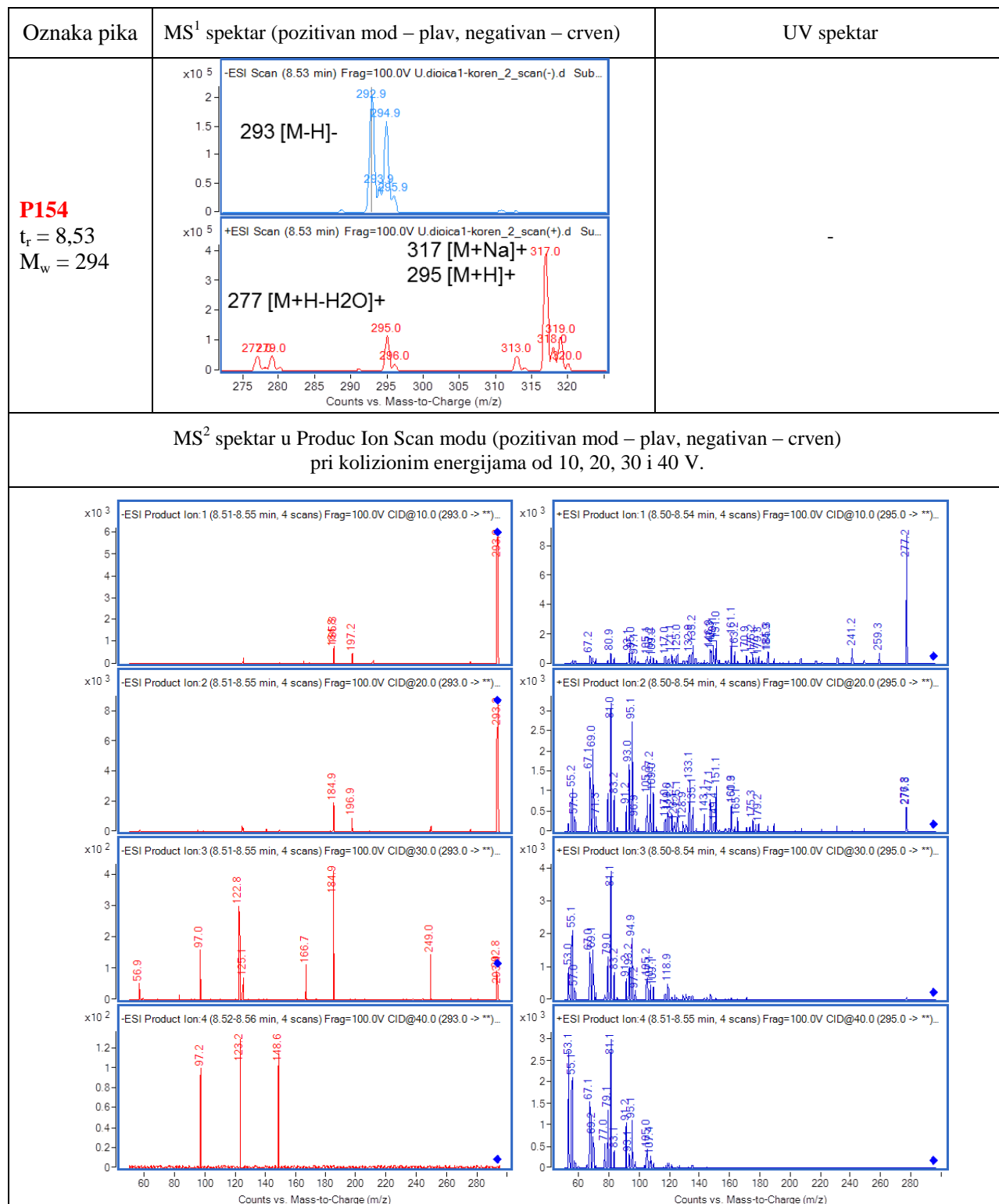
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P149 $t_r = 8,17$ $M_w = 294$</p>		-
<p>MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.</p>		
		

Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P150 $t_r = 8,17$ $M_w = 370$	<p>-ESI Scan (8.17 min) Frag=100.0V P.vulgaris2-koren_16_scan(-)...</p> <p>415 [M+HCOO]- 405 [M+Cl]-</p> <p>388.8 404.8 414.8 415.8</p> <p>+ESI Scan (8.17 min) Frag=100.0V P.vulgaris2-koren_16_scan(+)</p> <p>393 [M+Na]+</p> <p>393.0 394.0</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	-
MS ² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		
-		

Oznaka pika	
P151 $t_r = 8,20$ $M_w = 278$	Isti MS ¹ i MS ² spektri kao kod P146 i P147

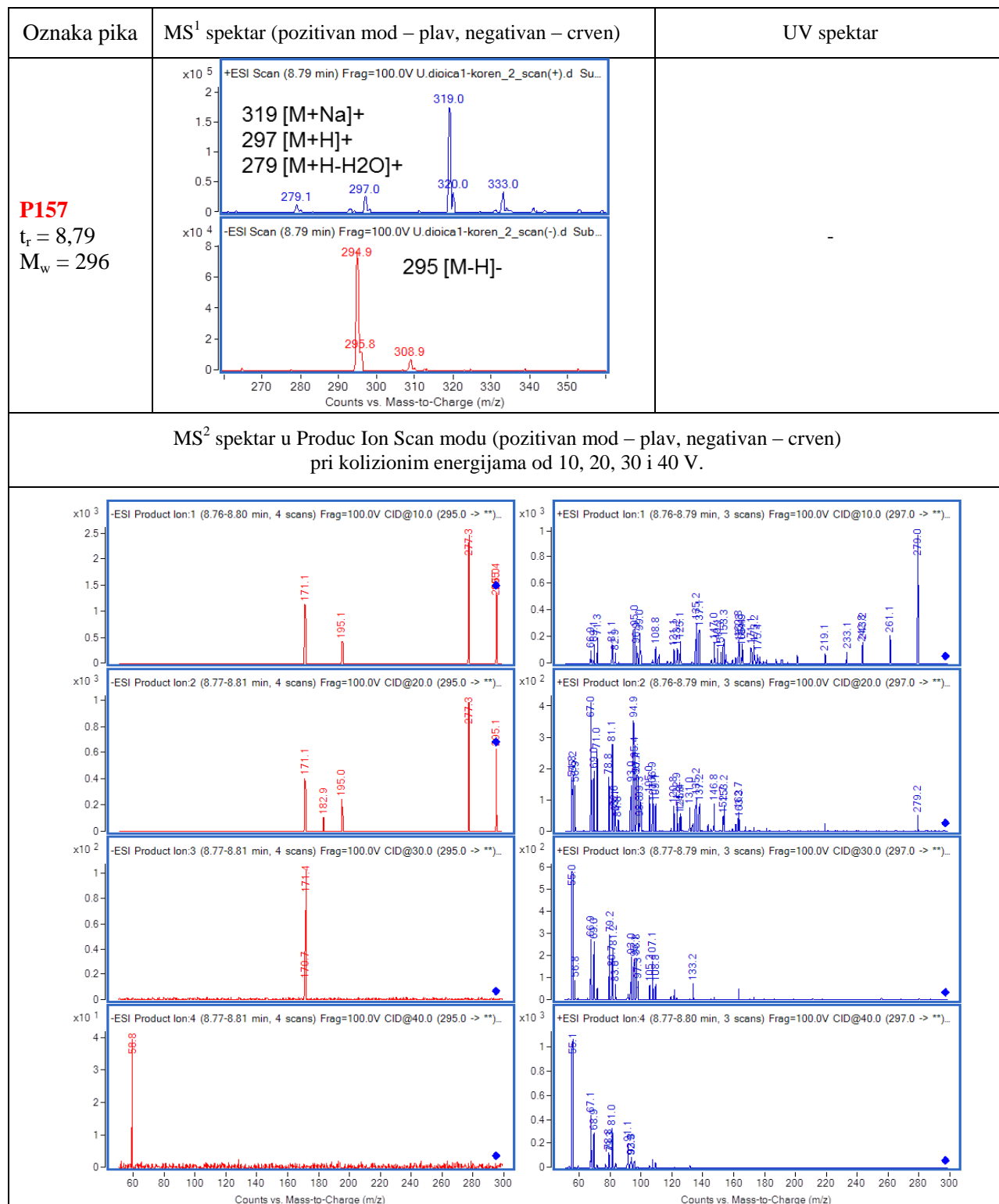
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P152 $t_r = 8,35$ $M_w = 270$</p>		-
MS ² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		

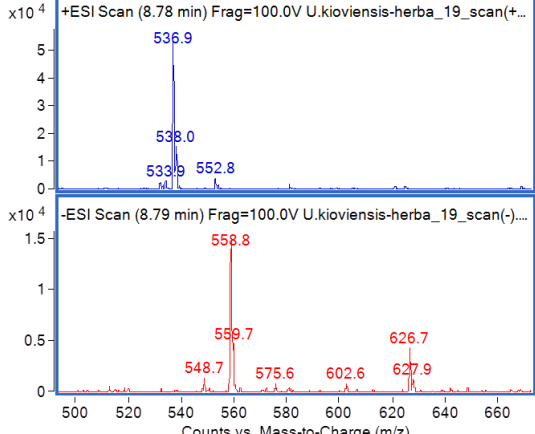
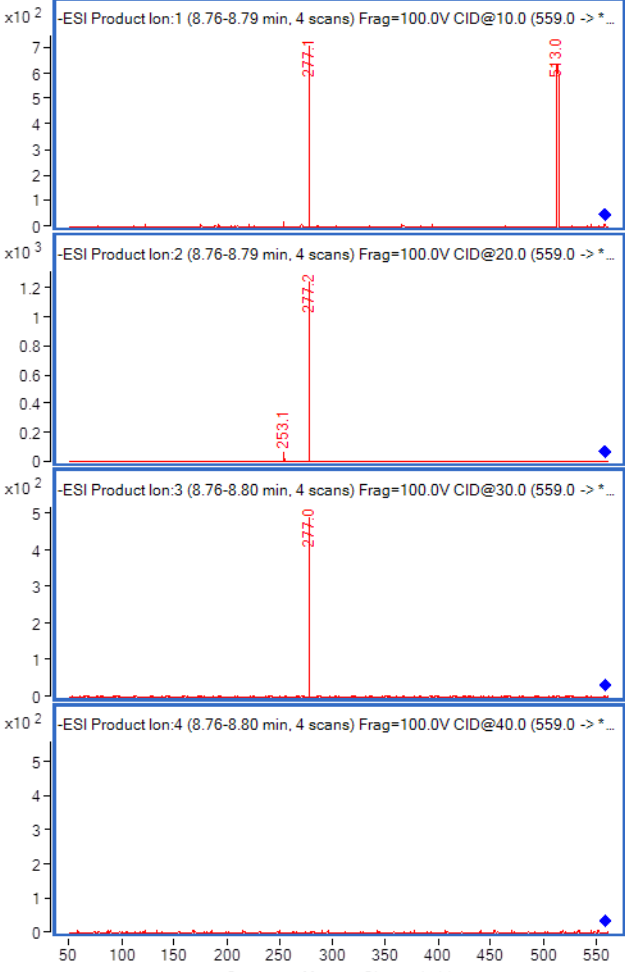




Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P155 $t_r = 8,55$ $M_w = 676$		-
MS ² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		
-		

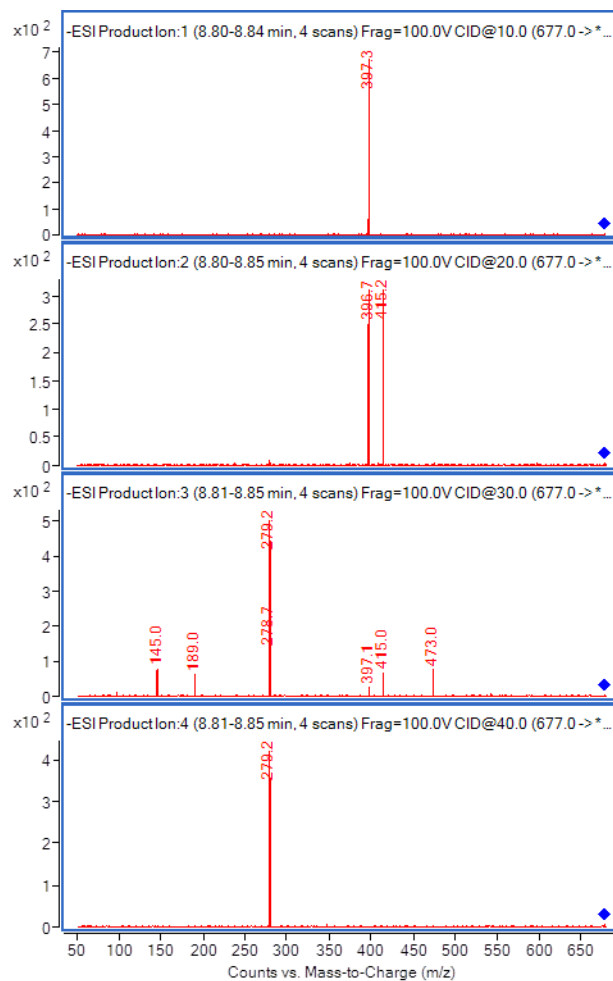
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P156 $t_r = 8,73$ $M_w = 678$		-
MS ² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		
-		



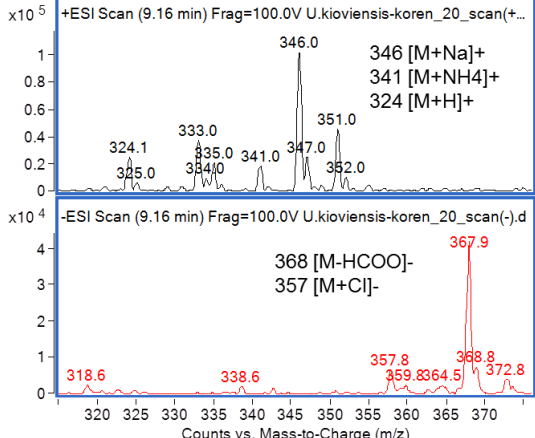
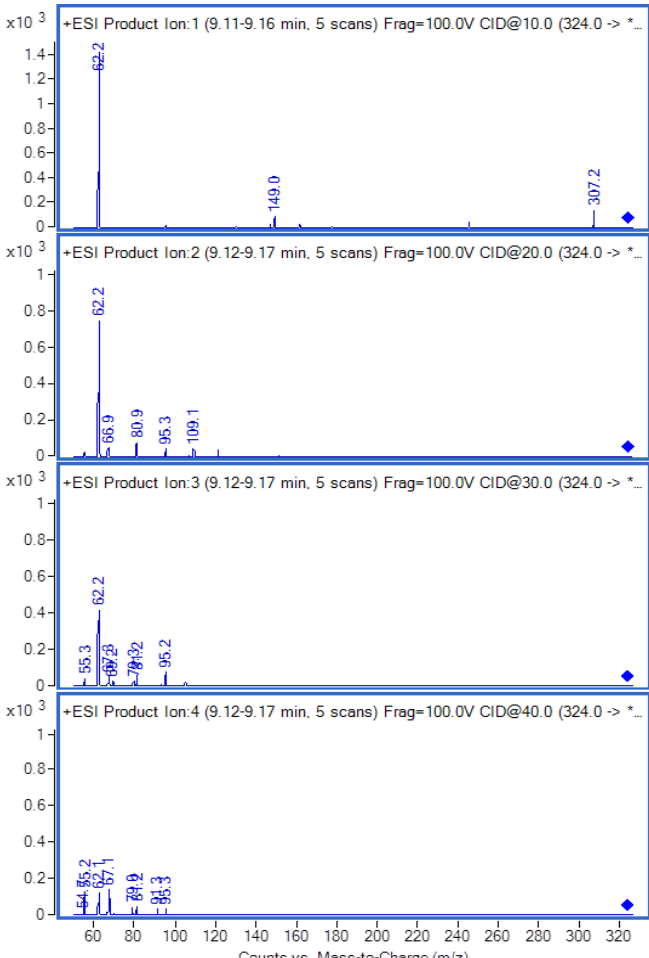
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P158 $t_r = 8,79$ $M_w = 514$</p>		-
<p>MS² spektar u Product Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.</p>		
		

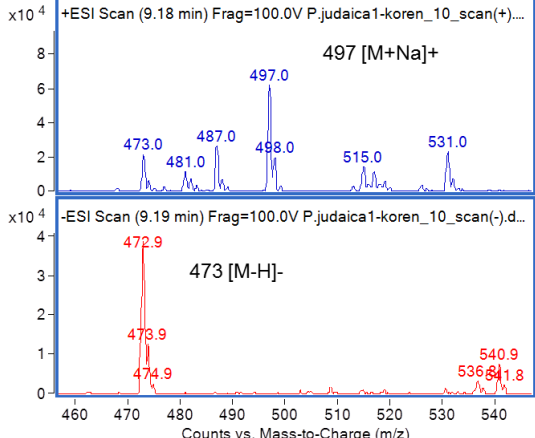
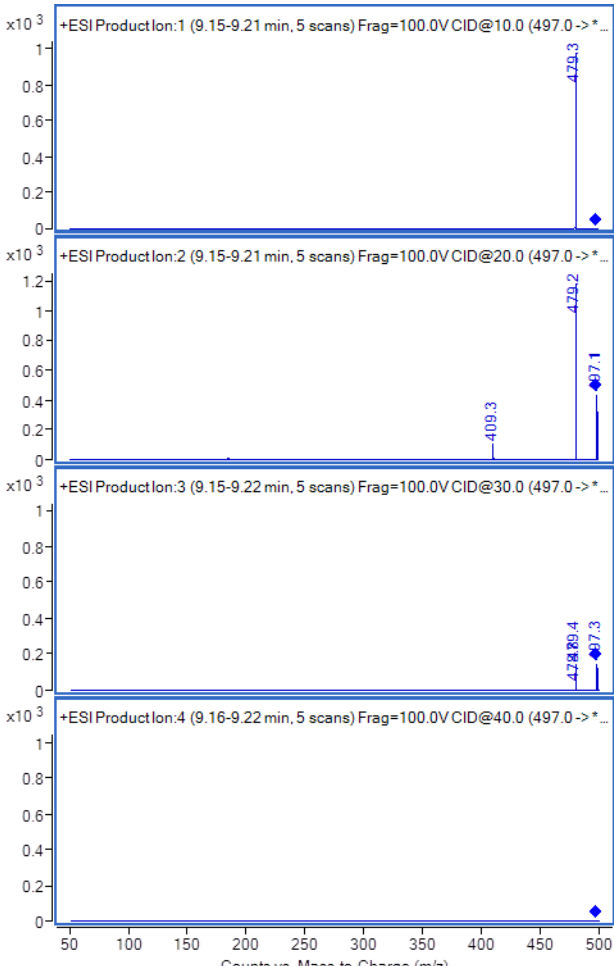
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
P159 $t_r = 8,83$ $M_w = 678$		-

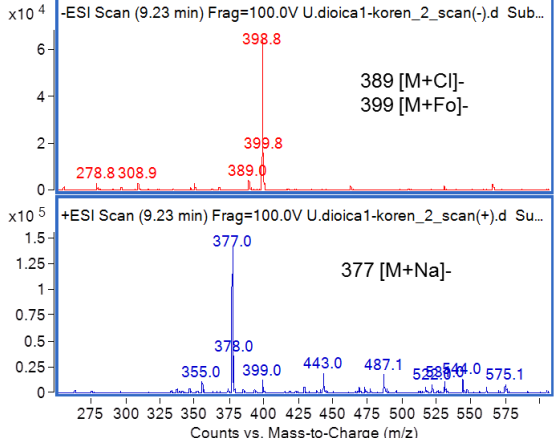
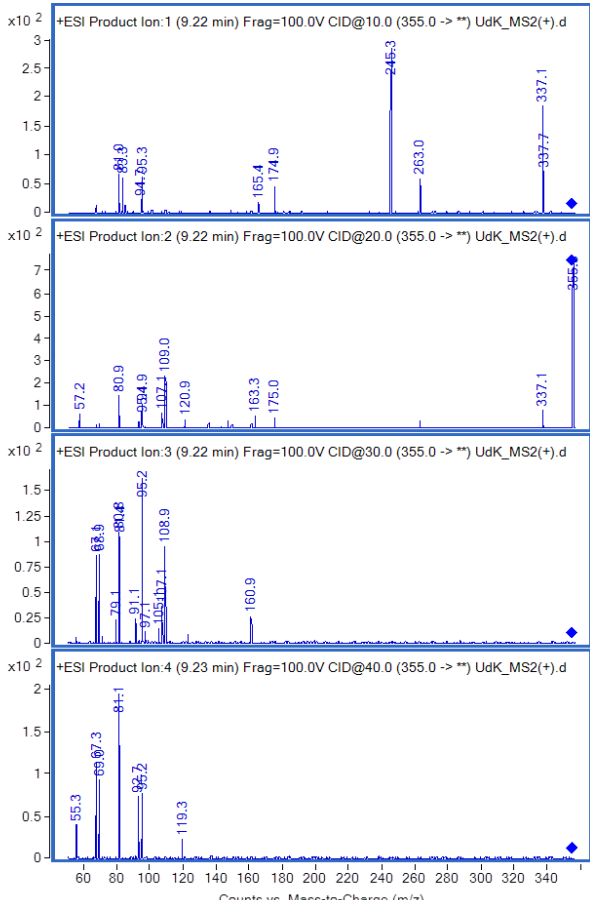
MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven)
pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.



Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P160 $t_r = 9,04$ $M_w = 516$</p>		-
MS ² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.		

Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P161 $t_r = 9,16$ $M_w = 323$</p>	 <p>+ESI Scan (9.16 min) Frag=100.0V U.kioviensis-koren_20_scan(+... $\times 10^5$ 346.0 346 [M+Na]⁺ 341 [M+NH₄]⁺ 324 [M+H]⁺ 324.1 325.0 333.0 335.0 341.0 347.0 351.0 352.0 -ESI Scan (9.16 min) Frag=100.0V U.kioviensis-koren_20_scan(-).d $\times 10^4$ 368 [M-HCOO]⁻ 357 [M+Cl]⁻ 318.6 338.6 357.8 359.8 364.5 367.9 368.8 372.8 Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	-
<p>MS² spektar u Product Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.</p>		
 <p>+ESI Product Ion:1 (9.11-9.16 min, 5 scans) Frag=100.0V CID@10.0 (324.0 -> *... $\times 10^3$ 62.2 149.0 307.2 +ESI Product Ion:2 (9.12-9.17 min, 5 scans) Frag=100.0V CID@20.0 (324.0 -> *... $\times 10^3$ 62.2 65.9 80.9 95.3 109.1 +ESI Product Ion:3 (9.12-9.17 min, 5 scans) Frag=100.0V CID@30.0 (324.0 -> *... $\times 10^3$ 62.2 55.3 67.1 79.9 95.3 +ESI Product Ion:4 (9.12-9.17 min, 5 scans) Frag=100.0V CID@40.0 (324.0 -> *... $\times 10^3$ 62.2 55.3 67.1 79.9 95.3 Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>		

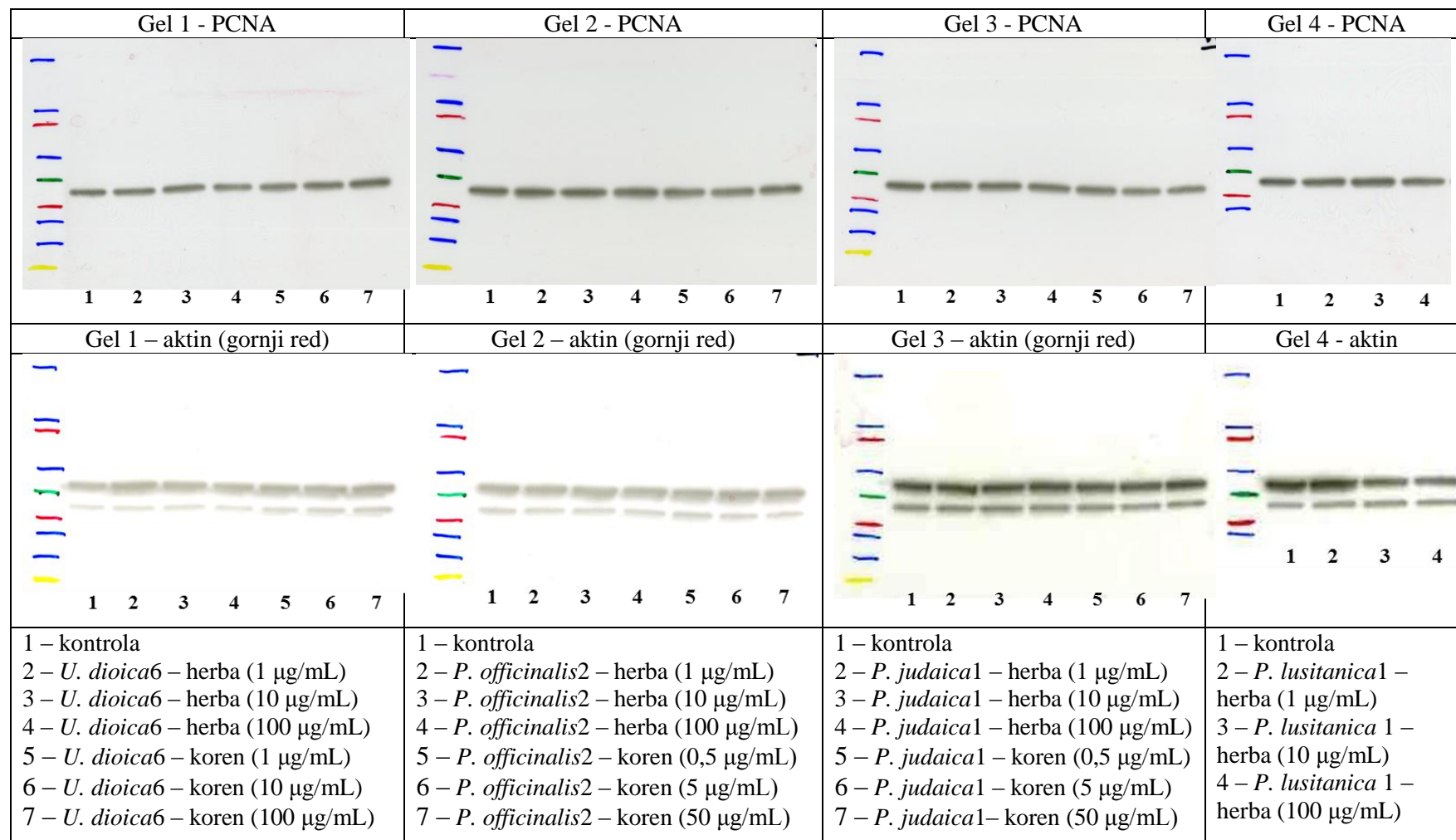
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P162 $t_r = 9,18$ $M_w = 474$</p>		-
<p>MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.</p>		
		

Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P163 $t_r = 9,23$ $M_w = 354$</p>	 <p>-ESI Scan (9.23 min) Frag=100.0V U.dioica1-koren_2_scan(-).d Sub...</p> <p>389 [M+Cl] 399 [M+Fo]</p> <p>+ESI Scan (9.23 min) Frag=100.0V U.dioica1-koren_2_scan(+).d Su...</p> <p>377 [M+Na]</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	-
<p>MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.</p>		
 <p>+ESI Product Ion:1 (9.22 min) Frag=100.0V CID@10.0 (355.0 -> **) UdK_MS2(+).d</p> <p>+ESI Product Ion:2 (9.22 min) Frag=100.0V CID@20.0 (355.0 -> **) UdK_MS2(+).d</p> <p>+ESI Product Ion:3 (9.22 min) Frag=100.0V CID@30.0 (355.0 -> **) UdK_MS2(+).d</p> <p>+ESI Product Ion:4 (9.23 min) Frag=100.0V CID@40.0 (355.0 -> **) UdK_MS2(+).d</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>		

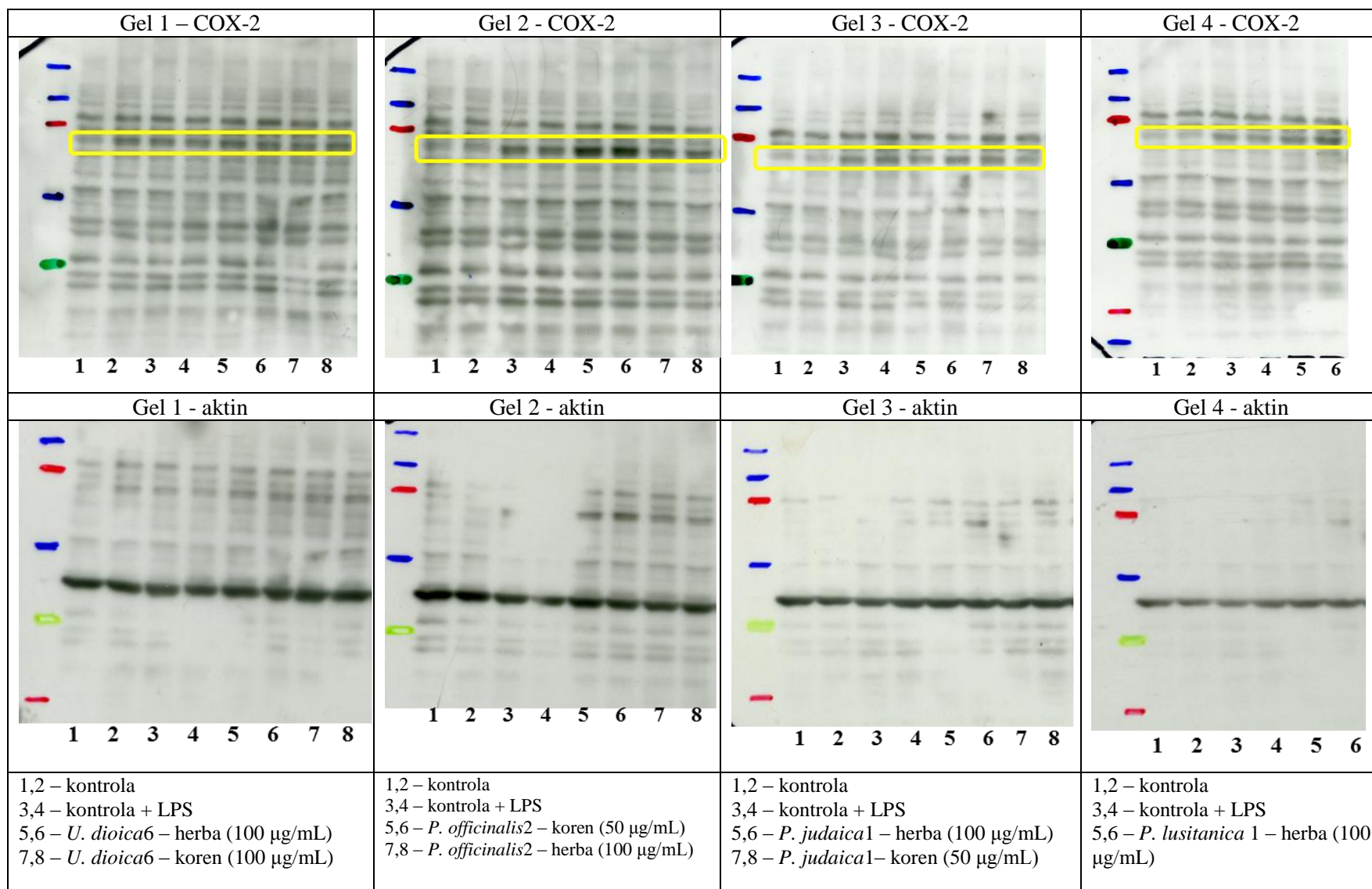
Oznaka pika	MS ¹ spektar (pozitivan mod – plav, negativan – crven)	UV spektar
<p>P164 $t_r = 9,31$ $M_w = 354$</p>		-
<p>MS² spektar u Produc Ion Scan modu (pozitivan mod – plav, negativan – crven) pri kolizionim energijama od 10, 20, 30 i 40 V.</p>		

REZULTATI WESTERN BLOT ANALIZE – slike gelova

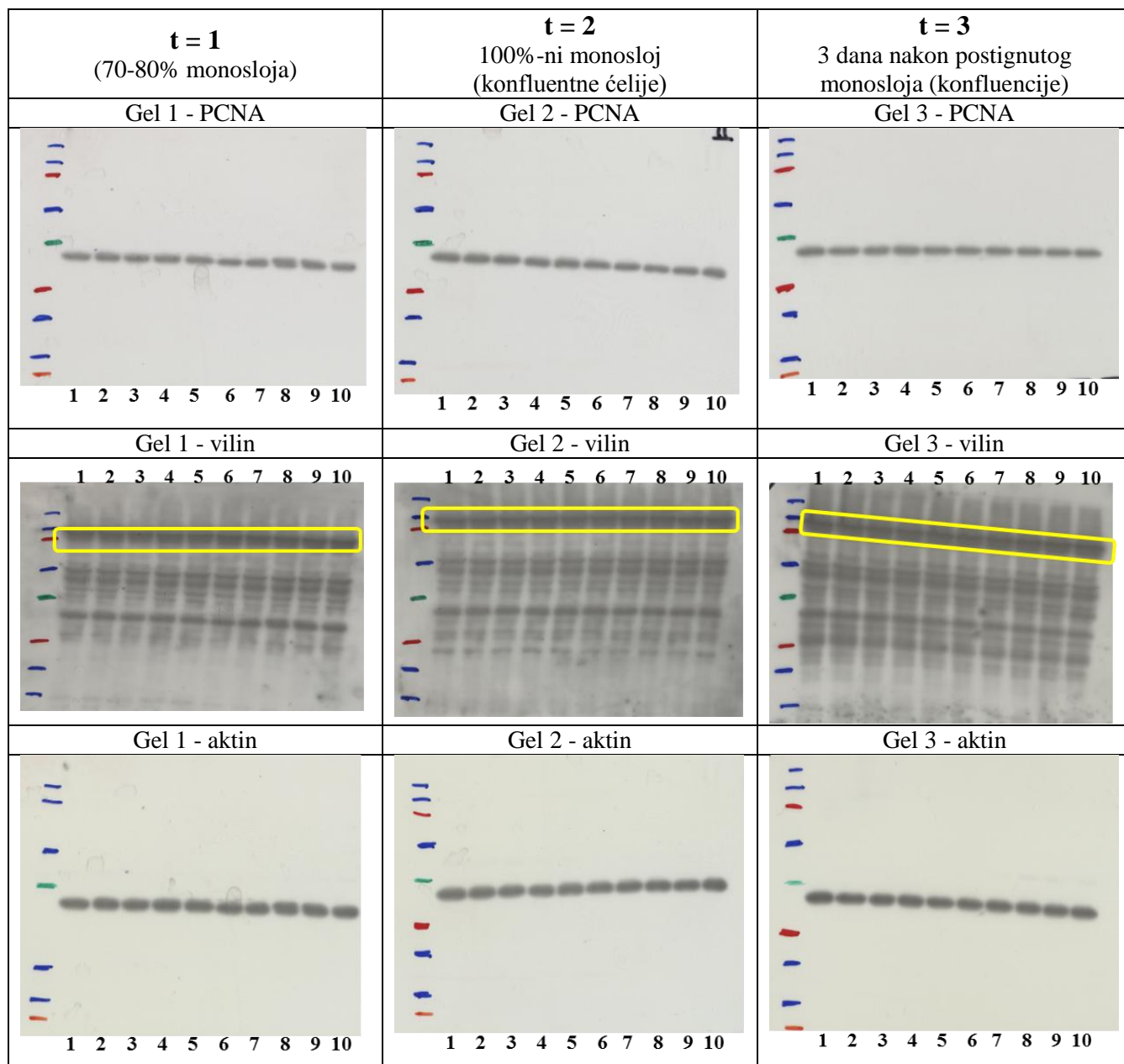
Kvantifikacija PCNA iz IEC18 ćelija



Kvantifikacija COX-2 iz IEC18 ćelija



Kvantifikacija PCNA i vilina iz Caco2 ćelija

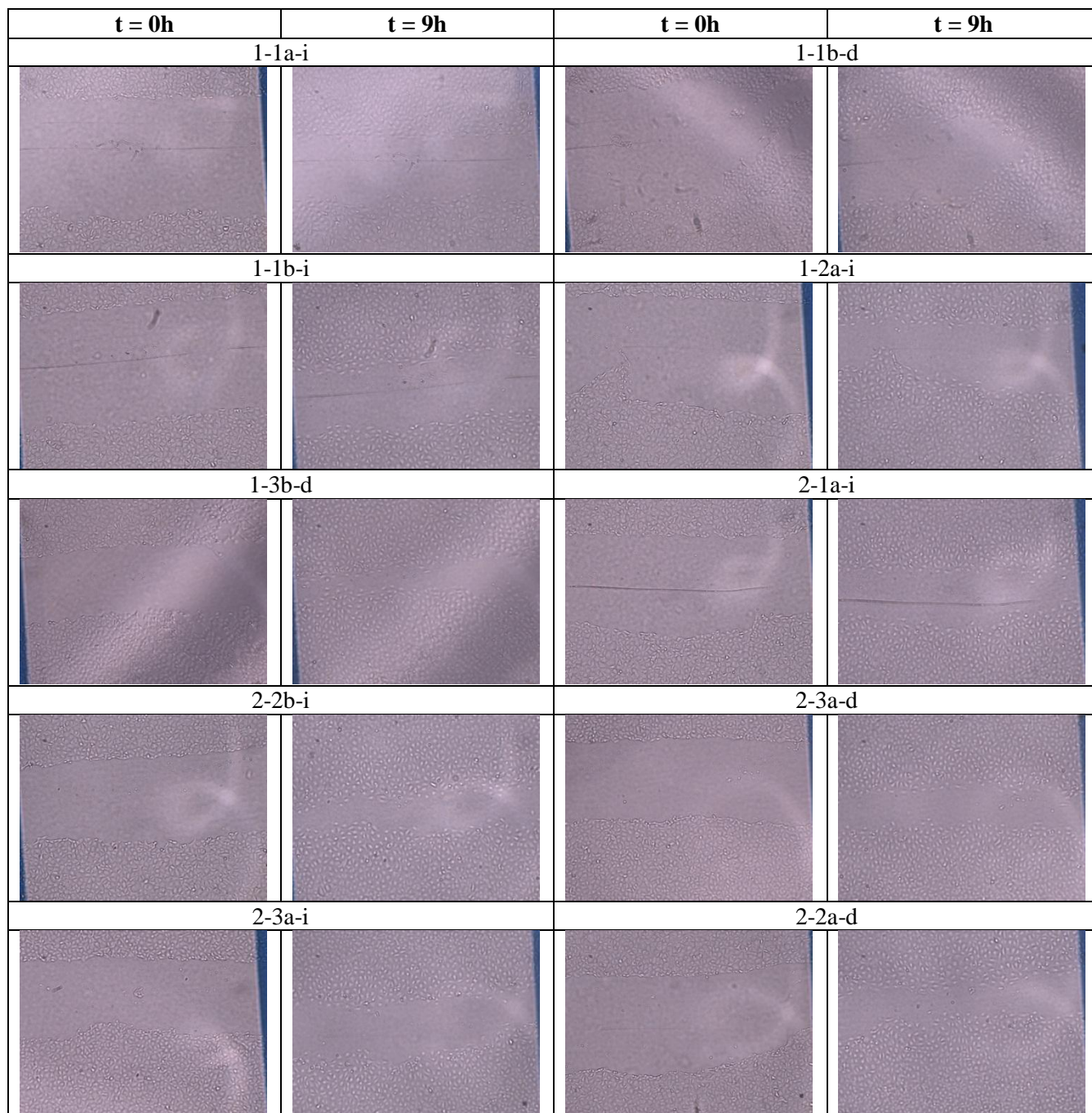
**Za sve gelove:**

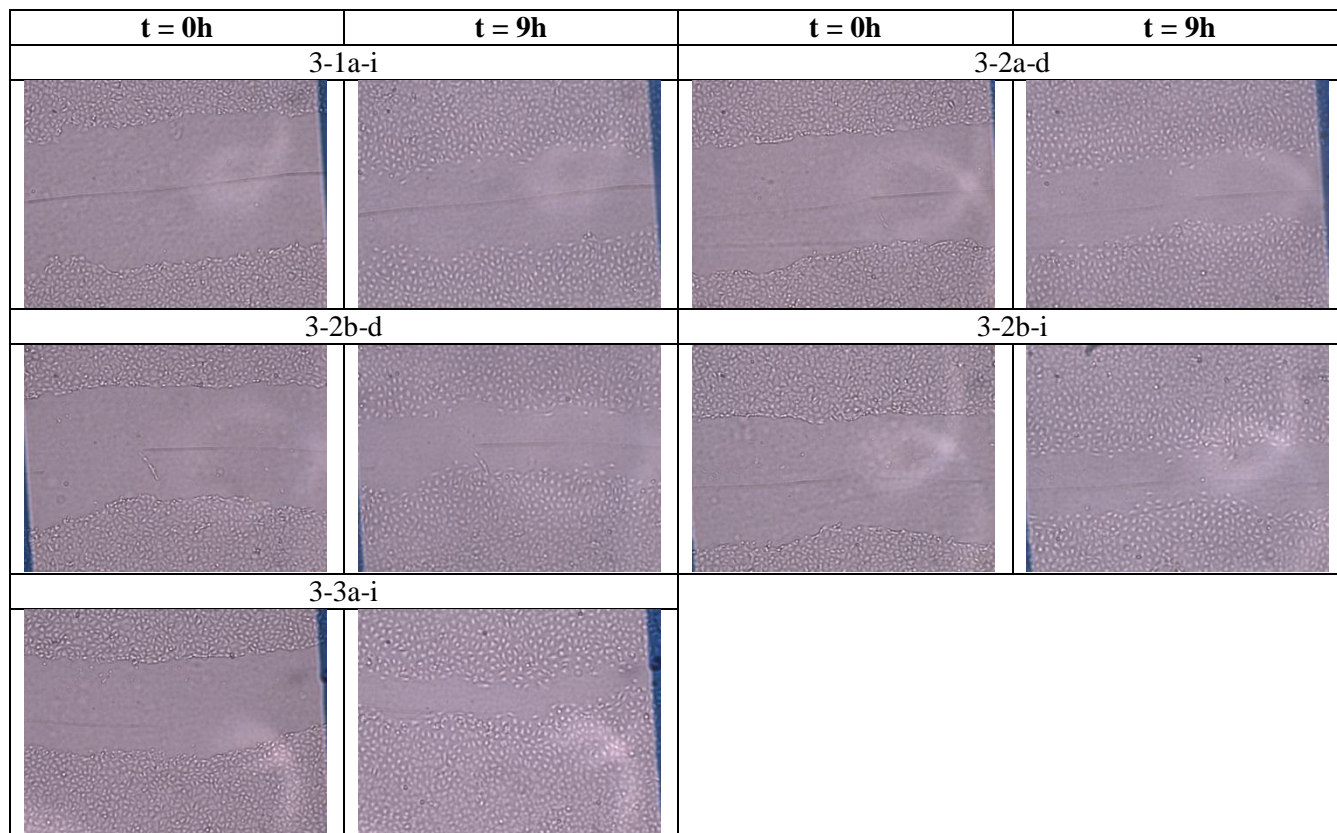
1,2 – kontrola

3,4 – *P. officinalis*2 – herba (10 µg/mL)5,6 – *P. officinalis*2 – herba (100 µg/mL)7,8 – *P. officinalis*2 – koren (5 µg/mL)9,10 – *P. officinalis*2 – koren (50 µg/mL)

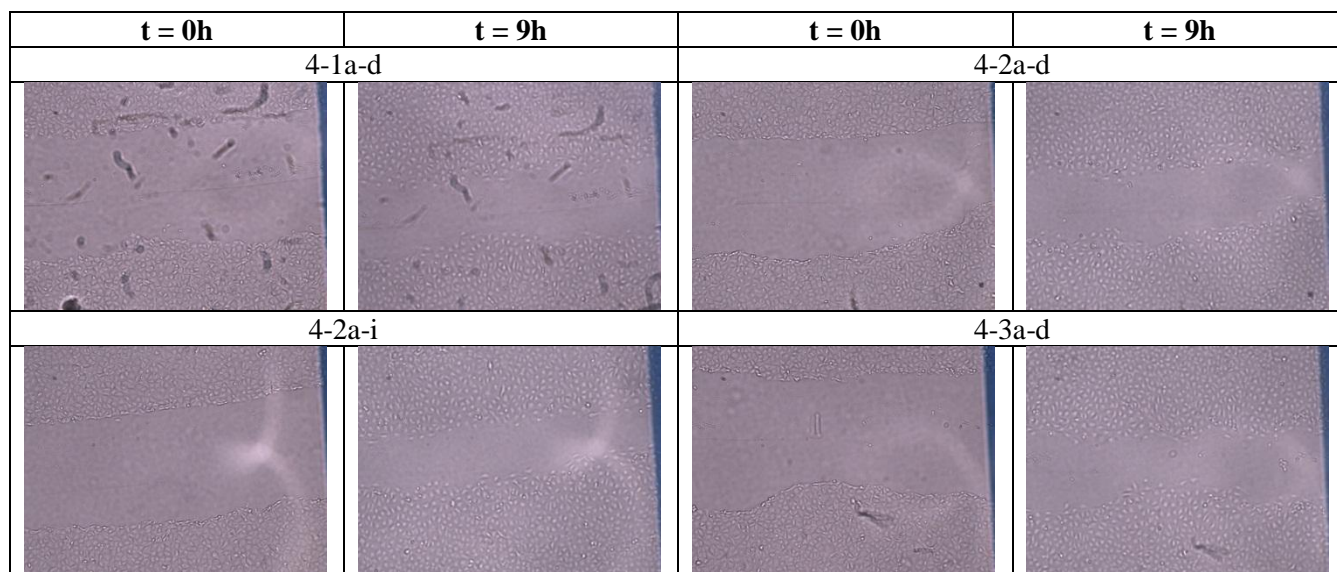
REZULTATI EKSPERIMENTA ZARASTANJA “RANA” – EFEKAT EPITELITACIJE

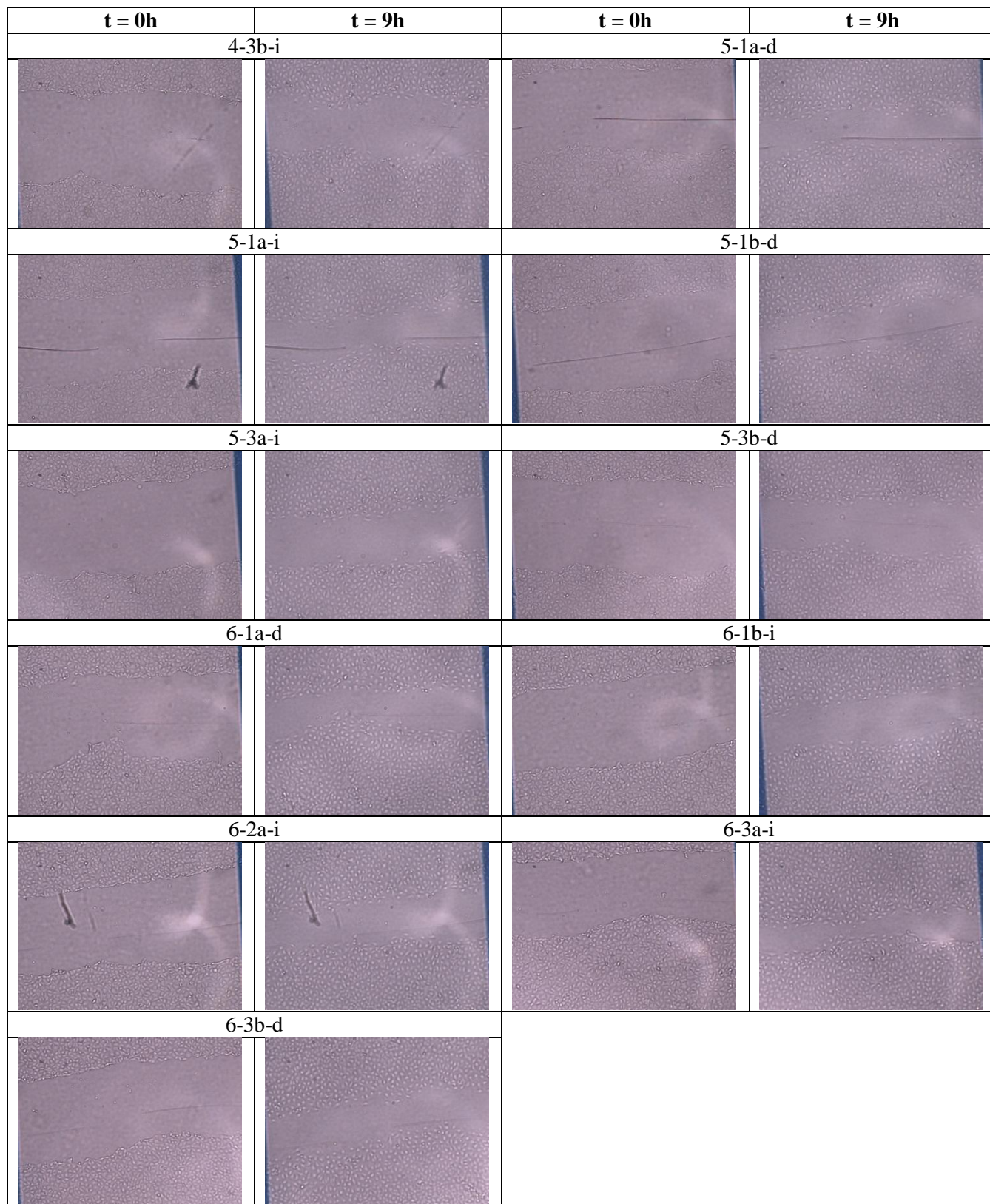
Slike proreza ili rana na IEC18 monosloju pre i nakon 9h inkubacije samo u medijumu pri uvećanju od 40x – KONTROLA.



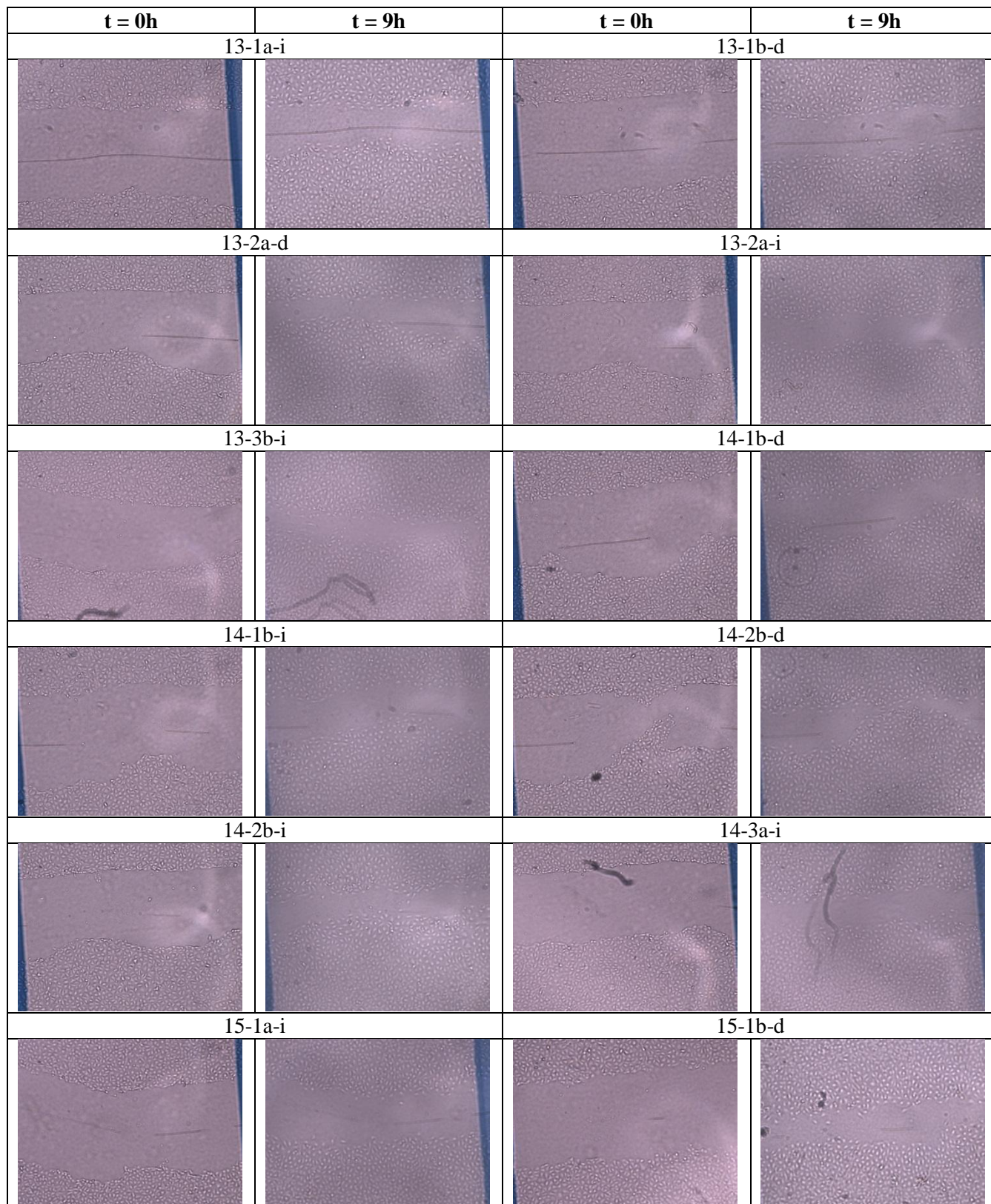




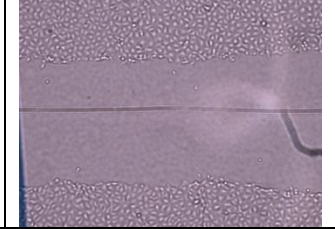
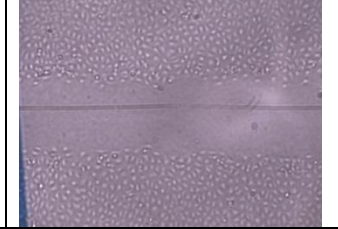
Slike proreza ili rana na IEC18 monosloju pre i nakon 9h inkubacije sa **ekstraktom herbe vrste *P. officinalis*** (10 µg/mL) pri uvećanju od 40x.





Slike proreza ili rana na IEC18 monosloju pre i nakon 9h inkubacije sa **ekstraktom korena vrste *P. officinalis*** (5 µg/mL) pri uvećanju od 40x.



t = 0h	t = 9h	t = 0h	t = 9h
15-2a-d		15-2b-i	
			
15-3b-d			
