

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ ФАКУЛТЕТ

Уна-Јована В. Вајић

ОПТИМИЗАЦИЈА  
ЕКСТРАКЦИЈЕ И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА  
ЕКСТРАКТА ЛИСТА *Urtica dioica* L. ЗА  
ПОТРЕБЕ ИСПИТИВАЊА  
ДОЗНО-ЗАВИСНОГ ОДГОВОРА У  
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОЈ  
ХИПЕРТЕНЗИЈИ

Докторска дисертација

Београд, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Una-Jovana V. Vajić

OPTIMIZATION OF EXTRACTION AND  
CHARACTERIZATION OF *Urtica dioica* L. LEAF  
EXTRACT FOR THE EVALUATION OF DOSE-  
DEPENDENT RESPONSE IN EXPERIMENTAL  
HYPERTENSION

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

Чланови комисије:

---

Ментор: Др Бранко Бугарски, редовни професор,  
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

---

Коментор: Др Невена Михаиловић-Станојевић, научни саветник,  
Универзитет у Београду, Институт за медицинска истраживања

---

Др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор,  
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

---

Др Јелица Грујић Милановић, виши научни сарадник,  
Универзитет у Београду, Институт за медицинска истраживања

---

Др Јелена Живковић, научни сарадник,  
Институт за проучавање лековитог биља "Др Јосиф Панчић"

Датум одбане:

---

*родитељима и сестри*

Ова докторска дисертација урађена је у оквиру истраживања предложених у подпројекту „Испитивање улоге активних компоненти *Thymus serpyllum* L. и *Urtica dioica* L. са подручја Србије у експерименталним моделима кардиоваскуларних обољења“ у оквиру пројекта интегралних и интердисциплинарних истраживања (ИИИ 46010): „Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонента хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности“, финансираног од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, 2011-2017.

Експериментални део рада ове докторске дисертације је изведен у Групи за кардиоваскуларну физиологију Института за медицинске истраживања, Универзитета у Београду, затим лабораторијама Института за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“, Института за хемију, технологију и металургију, Универзитета у Београду, као и лабораторијама Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду.

## **Захвалница**

*Пре свега, велику захвалност дугујем својим колегама из Групе за кардиоваскуларну физиологију Института за медицинска истраживања, како за професионалне и пријатељске савете, тако и за прилику да са њима сарађујем и од њих учим и своје знање и вештине проширим и на поље биомедицине.*

*Посебно хвала мојој менторки др Невени Михаиловић-Станојевић на свестраној помоћи, саветима, али и стрпљењу који су били пресудни како за сам ток и израду ове тезе, тако и за мој истраживачки развој. Њен ентузијазам и енергија су ми све време били значајан покретач и инспирација.*

*Мом ментору др Бранку Бугарском хвала на сугестијама и подршци у кључним тренуцима у току мојих докторских студија.*

*Др Јелици Грујић Милановић хвала на помоћи и стрпљењу, како при изради ове тезе, тако и при савладавању експерименталних метода и техника из области биомедицине.*

*Драгом колеги др Милану Иванову пре свега хвала на пријатељским сугестијама, али и знању и вештинама из области биомедицине које је несебично делио са мном све ове године.*

*Колеги др Зорану Милорадовићу желим од срца да се захвалим на дивним дискусијама које су ми помогле да савладам занимљиво и захтевно поље кардиоваскуларне физиологије.*

*Др Ђурђици Јововић пре свега хвала на указаном поверењу и прилици да радим у оквиру Групе за кардиоваскуларну физиологију Института за медицинска истраживања. Неизмерно хвала јој дугујем за савете и подршку који чак превазилазе и професионалне оквире, а што је и чини изврсним руководицем.*

*Др Катарини Шавикин и др Јелени Живковић хвала на неизмерној помоћи, саветима и сугестијама који су били од кључног значаја како за велики део истраживања у оквиру ове тезе, тако и за њену финалну форму.*

*Драгим колегама Данијели Карановић, Алесандри Јованвић, Предрагу Петровићу, Нади Ђујић и Катарини Букари другарско хвала на пријатељским саветима и помоћи у току свих ових година.*

*И на крају, хвала мојим пријатељима, породици и пре свега, сестри Бојани на стрпљењу и подршци.*

# ОПТИМИЗАЦИЈА ЕКСТРАКЦИЈЕ И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ЕКСТРАКТА ЛИСТА *Urtica dioica* L. ЗА ПОТРЕБЕ ИСПИТИВАЊА ДОЗНО-ЗАВИСНОГ ОДГОВОРА У ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОЈ ХИПЕРТЕНЗИЈИ

## Резиме

Савремени начин живота карактеришу фактори који значајно могу да допринесу настанку и развоју кардиоваскуларних болести. У њих се, између осталог, убрајају неправилан начин исхране и недостатак физичке активности. Према извештајима Светске здравствене организације, кардиоваскуларне болести у хуманој популацији представљају један од водећих узрока морталитета. С друге стране, хипертензија је један од водећих фактора ризика за настанак и прогресију кардиоваскуларних обољења. Статистички подаци Светске здравствене организације указује на алармантне податке - чак милијарду људи широм света болује, док око девет милиона људи годишње премине од компликација изазваних хипертензијом. У циљу превенције и/или ублажавања последица хипертензије јавила се потреба за интезивним изучавањем потенцијалних извора природних антиоксиданса који би својим деловањем могли да доведу до смањења интензитета и учесталости компликација узрокованих овом болешћу.

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације су била усмерена ка оптимизацији екстракционих параметара са циљем постизања максималног приноса фенолних једињења у екстракту листа коприве (*Urtica dioica* L.). Поред тога, вршена је карактеризација фенолних једињења и одређивање антиоксидативног капацитета екстракта. Екастракт са највишим садржајем фенолних једињења је испитиван у моделу експерименталне хипертензије са циљем

утврђивања његовог утицаја на оксидативни и хемодинамски статус, биохемијске параметре и липидни статус.

У овој студији је показано да су најзаступљенија фенолна једињења листа коприве рутин, хлорогенска и 2-О-кафеоил мална киселина. Такође су детектовани *p*-кумароил малат, кафена киселина, изокверцетин, кемферол-3-О-рутинозид, изорамнетин-3-О-рутинозид и изораметин хексозид. Са становишта садржаја укупних фенола, као и садржаја појединачних фенолних једињења, од испитиваних екстракционих средстава, водено-метанолни су показали боље екстракционе карактеристике од водено-етанолних, као и од чисте воде. Ултразвучна екстракција се показала најефикаснијом екстракционом методом по питању садржаја укупних фенолних једињења и флавоноида, хлорогенске и кафене киселине, али и када је у питању антиоксидативни капацитет екстраката. Оптимизација екстракционих параметара је показала да садржај метанола у екстракционом средству има значајан утицај на принос фенолних једињења у екстрактима, за разлику од трајања екстракције. Показано је да се највиши принос укупних фенолних једињења постиже ултразвучном екстракцијом са 54%-тним метанолом у трајању од 38 минута. Суви екстракт листа коприве добијен екстракцијом под оптималним екстракционим параметрима (*UE*) је показао вишеструко виши антиоксидативни капацитет од конвенционалног антиоксиданса (*BHT*), нижи антиоксидативни капацитет него витамин Ц, али и изражен афинитет ка хелирању јона гвожђа. Четворонедељни третман пацова са урођеном хипертензијом (*SHR*, енгл. *spontaneously hypertensive rats*) овим екстрактом у дозама од 10, 50 и 200 mg/kg на дан је довео до снижења систолног и дијастолног крвног притиска, док је третман са две више дозе снизио и средњи артеријски притисак. Поред тога, третман са све три *UE* дозе је довео и до смањења минутног волумена срца *SHR*, без промене укупног периферног отпора и фреквенце срчаних контракција. Такође, третман са *UE*, без обзира на примењену дозу, је довео и до повећања садржаја нитрита и



нитрата у плазми и урину *SHR*. Оксидативни статус *SHR* је након *UE* третамана био побољшан, због повећаног антиоксидативног капацитета и смањења липидне пероксидације у плазми, као и због повећане активности ензима антиоксидативне заштите (супероксид дисмутазе и каталазе). Третман са све три дозе екстракта је довео и до побољшања липидног статуса повећањем *HDL*, снижењем односа укупан холестерол/*HDL*, као и смањењем индекса атеросклерозе. Примена највише дозе *UE* (200 mg/kg на дан) довела је до повећења *TBARS* вредности у еритроцитима и урину експерименталних животиња. Третман са дозама екстракта од 50 и 200 mg/kg на дан је довео до повећања експресије *eNOS* ензима у бубрегу, док је третман са све три *UE* дозе довео до смањења експресије *nNOS* ензима у ткиву бубрега.

Оптимизацијом екстракционих параметара је добијено да су за максималан принос фенолних једињења из листа коприве оптимални следећи услови: 54%-тни метанол, трајање екстракције од 38 минута и ултразвучна екстракција као екстракциона метода, и показано је да овако добијени екстракт има високу антиоксидативну активност. *In vivo* студија је показала да четворонедељна примена екстракта листа коприве повољно утиче на хемодинамски и системски оксидативни статус *SHR* независно од примењене дозе, промовишући дозу од 10 mg/kg т.м. на дан оптималним и корисним потенцијалним додатком исхране хипертензивних субјеката. Поред тога, у овом експерименталном моделу, третман са екстрактом листа коприве је побољшао липидни статус и извршио модулацију експресије појединих изоформи *NOS* ензима у бубрегу експерименталних животиња.

**Кључне речи:** *оптимизација екстракције, коприва, Urtica dioica L., фенолна једињења, хипертензија, оксидативни стрес, липидни статус, ензими антиоксидативне заштите*

**Научна област:** *Технолошко инжењерство*

**Ужа научна област:** *Биохемијско инжењерство и биотехнологија*

**УДК број:**

# OPTIMIZATION OF EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF *Urtica dioica* L. LEAF EXTRACT FOR THE EVALUATION OF DOSE-DEPENDENT RESPONSE IN EXPERIMENTAL HYPERTENSION

## Summary

Modern life is characterized by factors that can significantly contribute to the development of cardiovascular diseases. These factors, among others, include irregular diet and lack of physical activity. According to the World Health Organization reports, cardiovascular diseases in the human population are one of the leading causes of mortality. On the other hand, hypertension is the leading risk factor for the progression of cardiovascular diseases. The World Health Organization statistics are alarming - hypertension affects one billion people worldwide, while nine million people a year die from hypertension-related complications. In order to prevent and/or alleviate the effects of hypertension, numerous studies of potential sources of natural antioxidants that could lead to a reduction in the intensity and frequency of hypertension have been conducted.

This doctoral dissertation is focused on the optimization of the extraction parameters necessary to achieve the maximum yield of phenolic compounds in the *Urtica dioica* L. (stinging nettle) leaf extracts. Furthermore, characterization of phenolic compounds and determination of the antioxidant capacity of the extracts were performed. The extract with the highest content of phenolic compounds was then tested in the model of experimental hypertension to determine its effects on oxidative and hemodynamic status, lipid profile, and biochemical parameters.

We showed that the most abundant phenolic compounds in the *Urtica dioica* L. leaf extracts are rutin, chlorogenic, and 2-O-caffeic malic acid. In addition, *p*-coumaroyl malate, caffeic acid, isoquercetin, kaempferol-3-O-rutinoside, isorhamnetin-3-O-

rutinoside, and isorhamnetin hexoside have also been detected. Based on total phenolic yield and yields of individual phenolic compounds in the extracts, it was shown that aqueous-methanol had better extraction characteristics than aqueous-ethanol and water. Ultrasound-assisted extraction proved to be more effective extraction method given the fact that the content of total phenolic compounds and flavonoids, chlorogenic and caffeic acid, as well as the antioxidative capacities were higher in extracts prepared using ultrasound. Optimization of the extraction parameters showed that the content of methanol in the solvent significantly influenced the yield of phenolic compounds in the extracts, as opposed to extraction time. The highest yield of total phenolic compounds was achieved by ultrasound-assisted extraction with 54% aqueous-methanol and 38 min extraction time. The dry *Urtica dioica* L. leaf extract (UE), obtained by the ultrasound-assisted extraction and optimal extraction parameters (54% aqueous-methanol and 38 min extraction time), showed a higher antioxidant capacity than conventional antioxidant (BHT), but lower than vitamin C. Furthermore, UE showed good metal chelating ability.

Four-week long treatment of spontaneously hypertensive rats (SHR) with 10, 50 and 200 mg/kg/day of UE resulted in a decrease in systolic and diastolic blood pressure, while treatment with two higher doses (50 and 200 mg/kg/day of UE) lowered the mean arterial pressure, too. Also, treatment with all three UE doses decreased the cardiac output, without changing the total peripheral vascular resistance and the heart rate of the SHR. Treatment with all three UE doses increased nitrite and nitrate levels in plasma and urine of SHR. The oxidative status of SHR was improved after UE treatment as a result of the improvement of antioxidant capacity and lipid peroxidation in plasma, as well as because of increased antioxidant enzymes activities (superoxide dismutase and catalase). Treatment with all three UE doses improved lipid status of SHR by increasing HDL concentration, lowering the total cholesterol/HDL ratio, and decreasing the atherosclerosis index. Treatment with the highest UE dose (200 mg/kg per day) caused an

increase in TBARS in erythrocytes and urine of SHR. Treatment with 50 and 200 mg/kg/day of UE caused an increase in the expression of eNOS enzymes, while treatment with all three UE doses resulted in a decrease in the expression of nNOS enzymes in the kidney.

Using optimization of the extraction parameters, 54% aqueous-methanol and 38 min long ultrasound-assisted extraction were determined as optimal to yield the maximum total phenolic compounds in the *Urtica dioica* L. leaf extracts. Also, it was demonstrated that the extract obtained under these extraction conditions had high antioxidant activity. The *in vivo* study showed that four-week long treatment with *Urtica dioica* L. leaf extract has a beneficial effect on hemodynamic and systemic oxidative status of SHR, promoting a dose of 10 mg/kg/day as an optimal and useful potential nutritional supplement for hypertensive subjects. Additionally, in this experimental model, treatment with *Urtica dioica* L. leaf extract improved the lipid status and caused the modulation of expression of certain isoforms of NOS enzymes in the kidney of SHR.

**Keywords:** optimization of extraction, stinging nettle, *Urtica dioica* L., phenolic compounds, hypertension, oxidative stress, lipid profile, antioxidant enzymes

**Scientific field:** *Technological engineering*

**Scientific subfield:** *Biochemical engineering and biotechnology*

**UDC number:**

# Садржај

Увод.....	1
<b>1. Преглед литературних података .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1. Хипертензија.....</b>	<b>5</b>
1.1.1. Патологија хипертензије.....	5
1.1.2. Регулација крвног притиска .....	6
1.1.2.1. Ендотел.....	7
1.1.2.2. Вазоактивне супстанце.....	8
1.1.2.3. Ренин-ангиотензин-алдостерон систем.....	11
1.1.2.4. Остали механизми регулације крвног притиска.....	13
1.1.3. Оксидативни стрес и антиоксидативна заштита.....	14
1.1.3.1. Супероксидни радикал.....	17
1.1.3.2. Хидроксилни радикал.....	19
1.1.3.3. Антиоксидативна заштита.....	19
<b>1.2. Фенолна једињења .....</b>	<b>21</b>
1.2.1. Флавоноиди.....	21
1.2.2. Фенолне киселине.....	23
<b>1.3. <i>Urtica dioica</i> L.....</b>	<b>24</b>
1.3.1. Морфолошке карактеристике .....	25
1.3.2. Хемијска једињења карактеристична за биљку <i>Urtica dioica</i> L.....	26
1.3.2.1. Флавоноиди биљке <i>Urtica dioica</i> L. ....	28
1.3.2.2. Фенолне киселине биљке <i>Urtica dioica</i> L. ....	29
1.3.2.3. Садржај укупних фенола, антиоксидативни капацитет и способност екстраката листа <i>Urtica dioica</i> L. да хелирају јоне метала..	30
<b>1.4. Екстракција .....</b>	<b>32</b>
1.4.1. Методе за екстракцију фенолних једињења .....	33
1.4.2. Литературни преглед параметара и метода екстракција активних једињења из биљке <i>Urtica dioica</i> L.....	37

1.5.	Биолошки ефекти екстраката <i>Urtica dioica</i> L. ....	41
1.5.1.	Антихипертензивна, хипотензивна, диуретичка, натриуретичка и хипоурикемична активност.....	41
1.5.2.	Антиоксидативни ефекти .....	43
1.5.3.	Утицај на липидни статус.....	44
2.	Циљеви рада.....	46
3.	Експериментална испитивања.....	48
3.1.	Биљни материјал-порекло и карактеристике .....	48
3.2.	Екстракција .....	48
3.2.1.	Мацерација.....	48
3.2.2.	Ултразвучна екстракција.....	49
3.2.3.	Лиофилизација .....	49
3.3.	Метода за одређивање садржаја укупних фенола у екстрактима листа <i>Urtica dioica</i> L. ....	51
3.4.	Метода за одређивање садржаја укупних флавоноида у екстрактима листа <i>Urtica dioica</i> L. ....	51
3.5.	LC/MS анализа екстраката листа коприве.....	51
3.6.	HPLC-DAD анализа.....	52
3.7.	Методe за одређивање антиоксидативног капацитета екстраката листа <i>Urtica dioica</i> L. ....	53
3.7.1.	FRAP метода .....	53
3.7.2.	DPPH метода .....	53
3.7.3.	TEAC метода.....	54
3.7.4.	Способност хелирања јона гвожђа .....	54
3.7.5.	Способност неутралисања супероксидног радикала.....	55
3.8.	Дизајн експеримента и RSM модел .....	55
3.9.	Испитивање <i>in vivo</i> ефеката третмана са екстрактом листа <i>Urtica dioica</i> L. ....	57

3.9.1.	Етичка изјава.....	57
3.9.2.	Експериментални протокол.....	57
3.9.3.	Хемодинамска мерења .....	58
3.9.4.	Узорковање крви, урина и бубрега.....	61
3.9.5.	Одређивање биохемијских параметара.....	63
3.9.5.1.	Концентрација метаболита азотног монооксида .....	63
3.9.5.2.	Одређивање степена липидне пероксидације .....	64
3.9.5.3.	Одређивање активности ензима антиоксидативне заштите у еритроцитима.....	64
3.9.5.3.1.	Одређивање садржаја хемоглобина у еритроцитима .....	65
3.9.5.3.2.	Одређивање активности супероксид дисмутазе .....	65
3.9.5.3.3.	Одређивање активности каталазе .....	66
3.9.5.3.4.	Одређивање активности глутатион пероксидазе .....	67
3.9.5.3.5.	Одређивање активности глутатион редуктазе .....	68
3.9.5.4.	Одређивање концентрације ензима антиоксидативне заштите у еритроцитима.....	69
3.9.5.5.	Western blot анализа.....	69
3.9.5.6.	Одређивање осталих биохемијских параметара .....	71
3.9.6.	Статистичка обрада података.....	74
4.	Резултати .....	75
4.1.	Оптимизација екстракције фенолних једињења из листа <i>Urtica dioica</i> L.....	75
4.1.1.	Садржај укупних фенола.....	76
4.1.2.	Резултати HPLC-DAD и LC/MS анализе .....	76
4.1.3.	Антиоксидативни капацитет екстраката.....	79
4.1.4.	RSM модел.....	79
4.1.5.	Утицај ултразвука на принос фенолних једињења и антиоксидативни капацитет екстраката .....	84
4.2.	Ефекти <i>in vivo</i> третмана са екстрактом листа <i>Urtica dioica</i> L.....	90
4.2.1.	Хемодинамски параметри.....	90

4.2.2.	Оксидативни статус и антиоксидативни капацитет.....	95
4.2.2.1.	Активност и експресија ензима антиоксидативне заштите у еритроцитима.....	95
4.2.2.2.	Антиоксидативни капацитет плазме и степен липидне пероксидације.....	98
4.2.3.	Биохемијски параметри.....	101
4.2.3.1.	Ниво нитрита и нитрата у плазми и екскреција нитрита и нитрата урином.....	101
4.2.3.2.	Липидни статус.....	102
4.2.3.3.	Остали биохемијски параметри .....	105
4.2.4.	Експресија NOS ензима у бубрегу.....	107
5.	Дискусија.....	109
6.	Закључци.....	128
	Литература.....	132
	Садржај слика.....	158
	Садржај табела.....	163
	Списак скраћеница.....	165
	Прилози.....	168



---

## Увод

Кардиоваскуларне болест се сматрају узроком чак једне трећине свих смртних случајева у свету годишње (WHO-World Health Organization, 2013). Од хипертензије болује милијарду људи у свету, од чега сваке године умре чак 9,4 милиона (Lim et al., 2012) и то обично услед компликација изазваних хипертензијом као што су мождани или срчани удар (WHO-World Health Organization, 2013). Хипертензија има негативан утицај на настанак и/или прогресију бројних кардиоваскуларних и бубрежних обољења као што су мождани удар, инфаркт миокарда, слабости срца, болести периферних крвних судова, као и хронична бубрежна слабост (Mancia et al., 2013). Удружена са факторима ризика, као што су неправилна исхрана, пушење, дислипидемија, гојазност, изостанак физичке активности, значајно доприноси настанку и развоју кардиоваскуларних обољења (Whelton et al. 2017). Стога се сматра одговорном за око 45% смртних случајева услед болести срца и око 51% смртних случајева услед можданог удара (WHO-World Health Organization, 2013). Повећање броја оболелих од хипертензије у свету је у сталном порасту. Сматра се да је узрок томе повећање светске популације и њено старење, нездрав начин исхране, недостатак физичке активности, гојазност и изложеност стресу (WHO-World Health Organization, 2013). С друге стране, атеросклероза, болест великих и средњих артерија, представља главни узрок срчаног и можданог удара и један је од главних узрочника смрти (Lusis 2010). Најчешћи фактори ризика за настанак и развој атеросклерозе су хиперлипидемија, хипертензија, неправилна исхрана, шећерна болест, гојазност, пушење, старосна доб, пол, као и наследни фактори (Lusis 2010).

Будући да се савремени начин живота повезује са неадекватном исхраном и све учесталијом појавом бројних хроничних обољења, а посебно кардиоваскуларних,

јавила се потреба за применом алтернативних природних супстанци и антиоксиданса којим би се постигло циљано заштитно дејство на организам. Због тога су изоловање и идентификација биолошки активних једињења из биљака, те њихова даља примена у циљу обogaћивања различитих производа овим једињењима, или пак њихово увођење као замена за неке од синтетских антиоксиданаса и могућност њихове примене као додатака исхрани, тренутно једна од најактуелнијих научно-истраживачких тема.

*Urtica dioica* L. (у народу позната још и под називом коприва или жара) је вишегодишња глобално распрострањена биљка са дугом традицијом примене у третману великог броја здравствених проблема. Лист коприве највише се користи за ублажавање реуматских тешкоћа, затим у третману инфекција доњих уринарних путева, док се корен користи највише у третману бенигне хиперплазије простате (Upton 2013). Лист коприве садржи широк спектар хемијских једињења, а од фенолних једињења, највише су заступљена кафена и хлорогенска киселина, као и катехин (Yildiz et al. 2008). Такође, утврђено је и присуство кумарина скополетина (Sajfrtová et al. 2005), као и за ову биљку специфичог УДА лектина (*Urtica dioica* L. аглутинин) (Upton 2013). Поред тога, потврђено је и присуство бројних флавоноида (Proestos et al. 2006; Spina et al. 2008), протеина (Sajfrtová et al. 2005; Upton 2013), минерала (Rosnitschek-Schimmel 1985), масних киселина и каротеноида (Guil-Guerrero et al. 2003), терпена, као и витамина Ц, К и витамина Б групе (Upton 2013). Такође, утврђено је да хемијски састав биљке јако варира и зависи од географског порекла, да није идентичан у свим деловима биљке, као и да се разликује између гајене и дивље биљке (Stepanović & Radanović, 2011). Бројне студије су се бавиле испитивањем позитивног терапијског дејства ове биљке и показале пре свега антиинфламаторне и аналгетичке ефекте (Chrubasik et al. 1997; Randall et al. 2008; Toldy et al. 2009), као и антилипемичке (Avci et al. 2006) и антиоксидативне (Cetinus et al. 2005; Toldy et al. 2005). Када су у питању кардиоваскуларни ефекти, неке *in*

---

*vitro/ex vivo* студије су показале вазодилататорна и антихипертензивна својства екстракта корена ове биљке (Qayyum et al. 2016; Testai et al. 2002). Такође, показана су диуретичка и натриуретичка својства екстракта различитих делова коприве, која би могла да доведу до снижења крвног притиска (Tahri et al. 2000). Поред тога, показана је и антиоксидативна активност екстракта коприве (Pourmorad et al. 2006; Kukrić et al. 2012), као и способност инхибиције липидне пероксидације (Gülçin et al. 2004).

У последње време посебно су актуелна испитивања фенолних једињења, секундарних метаболита биљака, која поседују антиоксидативна својства и којима се приписују повољни ефекти на здравље (Acosta-Estrada et al. 2014). Улога фенолних једињења у благотворним ефектима људске исхране богате воћем и поврћем је постала веома значајно поље истраживања (Del Rio et al. 2013). Генерално, прихваћен је став да се благотворни ефекти овакве исхране управо и приписују овим једињењима (Del Rio et al. 2013). Ова класа једињења је посебно интересантна за прехранбену и фармацеутску индустрију због доказаних позитивних ефеката у случају дијабетеса, кардиоваскуларних болести, рака и др. (Del Rio et al. 2013).

Због свега горе наведеног, од кључног је значаја постићи максималан принос фенолних једињења при њиховој екстракцији из полазног материјала. Међутим, структурна и физикохемијска разноврсност у оквиру ове групе једињења, као и разлике у структури биљног матрикса, не остављају могућност коришћења општег екстракционог протокола. Зато се при екстракцији захтева специфичан приступ сваком појединачном извору ових једињења. Бројни су фактори који утичу на ефикасност екстракције фенолних једињења, а најзначајнији међу њима су екстракционо средство, метода екстракције, температура, трајање екстракције, однос дрога/екстракционо средство, степен уситњености полазног биљног

материјала, мешање и  $pH$  вредност (Tsao & Deng 2004). У циљу максимизације приноса ових једињења, неопходно је одредити оптималне вредности поменутих фактора.

---

# 1. Преглед литературних података

## 1.1. Хипертензија

### 1.1.1. Патофизиологија хипертензије

Хипертензија представља хронично стање повишеног систолног артеријског притиска (изнад 140 mmHg) и/или дијастолног артеријског притиска (изнад 90 mmHg) (Carretero & Oparil 2000; Mancia et al. 2013). Упркос дугогодишњим истраживањима, патофизиологија хипертензије ни до данас није у потпуности разјашњена. Према узроку настанка, хипертензију можемо да поделимо на есенцијалну или примарну, од које пати 95% хипертензивних пацијената, и секундарну коју чини око 2% оболелих (Beevers et al. 2001). Есенцијална, примарна или још и идиопатска хипертензија се дефинише као стање повишеног крвног притиска које није последица реноваскуларне болести, бубрежне слабости, феохромоцитома, алдостеронизма, а такође није ни нека од моногенских форми хипертензије (Carretero & Oparil 2000). Дакле, код овог облика хипертензије (за разлику од секундарне хипертензије), узрок није познат. Фактори који доприносе настанку и развоју хипертензије најчешће укључују (Carretero & Oparil, 2000):

- гојазност,
- инсулинска резистенција,
- конзумација великих количина алкохола,
- повишен унос натријумових соли,
- старење,
- стрес,
- смањен унос калијума и калцијума,
- мањак физичке активности,
- мала телесна маса при рођењу,

- неуроваскуларне аномалије.

Постоје бројни физиолошки механизми који учествују у контроли крвног притиска, а поремећај у било ком од њих представља важну основу за настанак хипертензије. Од физиолошких механизма важну улогу у регулацији системске и регионалне хемодинамике имају ренин-ангиотензин-алдостерон систем, аутономни нервни систем, кинин-каликреин систем, атријумски натриуретички пептид, ендотел, али и вазоактивне супстанце пореклом из ендотела као што су ендотелини, азотни моноксид (NO), простациклини и хиперполаришући фактор пореклом из ендотела (*EDHF*, енгл. *endothelium-derived hyperpolarizing factors*) (Beever et al. 2001).

### 1.1.2. Регулација крвног притиска

Улога системске циркулације је допремање кисеоника и нутријената путем крви до свих ћелија организма и отклањање угљендиоксида и осталих отпадних продуката ћелијског метаболизма, одржавање оптималне рН вредности, као и циркулација протеина и ћелија имуног система (Klabunde 2012). Ово се постиже захваљујући разлици притисака коју обезбеђује основна пумпа организма – срце (Mohrman & Heller 2014). Веза између разлике притисака и протока крви се може описати помоћу једначине аналогне Омовом закону (Klabunde 2012):

$$\Delta P = Q \times R$$

$\Delta P$  - промена притиска,

$Q$  – проток,

$R$  - отпор.

Ова релација се може проширити на целу циркулацију помоћу параметара као што су укупни периферни васкуларни отпор, минутни волумен срца и средњи артеријски притисак тако што се средњи артеријски притисак дефинише као производ укупног периферног отпора и минутног волумена срца (Lifton et al. 2001).

На основу овога се може закључити да одржавање нормалног крвног притиска зависи од равнотеже између укупног периферног васкуларног отпора и минутног волумена срца. Дакле, до пораста крвног притиска може доћи или повећањем минутног волумена срца, и/или повећањем укупног периферног васкуларног отпора. Код већине хипертензивних пацијената минутни волумен срца је у физиолошким границама, док је вредност укупног периферног васкуларног отпора повишена (Beever et al. 2001). Укупни периферни васкуларни отпор зависи првенствено од отпора протоку крви кроз мале артерије и артероле, тако да промене у пречнику ових крвних судова имају изражен утицај на проток крви кроз њих па, последично, и на отпор (Klabunde 2012). С друге стране, пречници ових крвних судова зависе од контрактилне способности слоја глатко-мишићних ћелија који их обавија (Staessen et al. 2003). Продужена констрикција глатко-мишићних ћелија доводи до структурних промена зида артериола, што доводи до повећања укупног периферног васкуларног отпора (Beever et al. 2001). Поред тога, важну улогу у регулацији пречника артерија и артериола, па тиме и укупног периферног васкуларног отпора, игра и ендотел, једноћелијски слој који облаже унутрашњост крвних судова (Sandoo et al. 2010; Versari et al. 2009).

#### **1.1.2.1. Ендотел**

Ендотел, поред тога што представља селективно-пропустљиву структурну баријеру између крви и зида крвног суда, такође представља и фундаменталан хомеостатски орган контроле и регулације структуре и тонуца васкулатуре (Versari et al. 2009). Он је у стању да активно синтетише и лучи бројне факторе који активно учествују у регулацији хемодинамике (Јововић et al. 2003). Ови фактори се, у зависности од ефекта, могу поделити у две групе: вазодилаторне супстанце (NO, простагландини и EDHF) и вазоконстриктивне супстанце (ендотелински пептиди и фактор активације тромбоцита) (Јововић et al. 2003). На значај ендотела у регулацији крвног притиска указује и чињеница да се дисфункција ендотела сматра једном од

основних узрока настанка хипертензије (Taddei et al. 2003). Ендотелна дисфункција представља губитак нормалне функције ендотела и карактерише је смањена биорасположивост NO-а (Taddei et al. 2003). Смањење биодоступности NO-а може да буде последица смањења његове синтезе и/или повећања његове неутрализације од стране реактивних врста кисеоника (Taddei et al. 2003). У условима смањења биорасположивости NO-а, ендотел-зависна дилатација се може делимично надоместити осталим вазодилаторним агенсима као што су поједини простагландини и *EDHF* (Versari et al. 2009). Међутим, дисфункционалан ендотел постаје и извор фактора као што су ендотелин-1 (*ET-1*), тромбоксан *A2*, простагландин *H2*, као и реактивне врсте кисеоника, који у оваквим околностима имају негативан утицај на зид артерија, првенствено због њихових вазоконстриктивних и атерогених својства (Versari et al. 2009). Сматра се ипак да кључну улогу у смањењу биодоступности NO-а има повишена продукција реактивних врста кисеоника, и то посебно супероксидног радикала који реагује са NO-ом, чиме долази до формирања токсичних реактивних врста азота – пероксинитрита који имају негативне последице на структуру и функцију васкулатуре (Taddei et al. 1998; Sabo et al. 2007). Неки од основних генератора реактивних врста кисеоника у ендотелним, глатко-мишићним и инфламаторним ћелијама хипертензивних пацијената су *NADPH* оксидазе (енгл. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*), ксантин оксидазе (*XO*, енгл. *xanthine oxidase*), циклооксигеназе (*COX*, енгл. *cyclooxygenase*) али и ендотелна NO синтаза (*eNOS*, енгл. *endothelial nitric oxide synthase*) која постаје нефункционална у одсуству одговарајућег коензима (Versari et al. 2009).

#### **1.1.2.2. Вазоактивне супстанце**

Азотни моноксид представља најмоћнији вазорелаксирајући агенс, који на васкулатурну хомеостазу утиче још и тако што инхибира пролиферацију глатко-мишићних ћелија, агрегацију тромбоцита, адхезију моноцита и тромбоцита на



ендотел, оксидацију *LDL* (енгл. *low-density lipoprotein*) и експресију адхезионих молекула и ендотелина (Yetik-Anacak & Catravas 2006). Ово једињење се синтетише у ћелијама из аминокиселине *L*-аргинина помоћу фамилије *NOS* ензима (енгл. *nitric oxide synthase*) (Lundberg et al. 2008). Ова фамилија ензима се састоји од калцијум-зависних форми: неуралне изоформе (*nNOS*, енгл. *neural nitric oxide synthase*) и *eNOS* чије синтезе су конститутивне, и калцијум-независне изоформе, тзв. индуцибилне *NO* синтазе (*iNOS*, енгл. *inducible nitric oxide synthases*) (Southan & Szabo 1996). У физиолошким условима, доминантна изоформа у крвним судовима је *eNOS* и она се синтетише у ћелијама ендотела и тромбоцитима (Rafikov et al. 2011), *nNOS* је првенствено присутан у централном и периферном нервном систему (Southan & Szabo 1996), док је *iNOS* експримирана у ендотелним ћелијама, глатко-мишићним ћелијама крвних судова и макрофагама (Jovović et al. 2003).

Синтезу *NO*-а од стране *eNOS* активира такозвани „*shear stress*“ т.ј. истезање крвних судова до ког долази услед повећања протока крви, али и везивање разних вазокативних супстанци (ацетилхолин, брадикинин, супстанца *P* итд.) за рецепторе на ендотелним ћелијама (Klabunde 2012). Иако нестимулисане ћелије не синтетишу *iNOS*, капацитет за то постоји у скоро свакој ћелији организма (Morris et al. 1994). Ћелије имуног система (нпр. макрофаги), али и друге ћелије, као што су хепатоцити, глатко-мишићне, ендотелне ћелије и др. имају капацитет синтезе *iNOS* ако су стимулисане (Morris et al. 1994). Иако се фактори који стимулишу *iNOS* синтезу разликују у зависности од типа ћелије, скоро сви су или микроорганизми и производи њиховог метаболизма, или инфламаторни цитокини (Morris et al. 1994). Механизам *NO*-зависне вазодилатације се одвија тако што *NO* дифундује из ендотелних ћелија у глатко-мишићне ћелије крвних судова где активира ензим гуанилат циклазу (Klabunde 2012). Овај ензим затим катализује дефосфорилацију гуанозин трифосфата (*GTP*, енгл. *guanosine triphosphate*) у циклични гуанозин монофосфат (*cGMP*, енгл. *cyclic guanosine monophosphate*) који представља сигнални

молекула за неколико важних функција, међу којима је и релаксација глатко-мишићних ћелија (Klabunde 2012). *cGMP* остварује релаксацију ових ћелија тако што инхибира улазак калцијума у ћелију, затим активира калијумове канале што доводи до хиперполаризације и релаксације ћелије, и стимулише *cGMP*-зависну протеин киназу, чиме се започиње каскада биохемијских реакција која доводи до дефосфорилације миозина и, на крају, релаксације глатко-мишићних ћелија (Klabunde 2012).

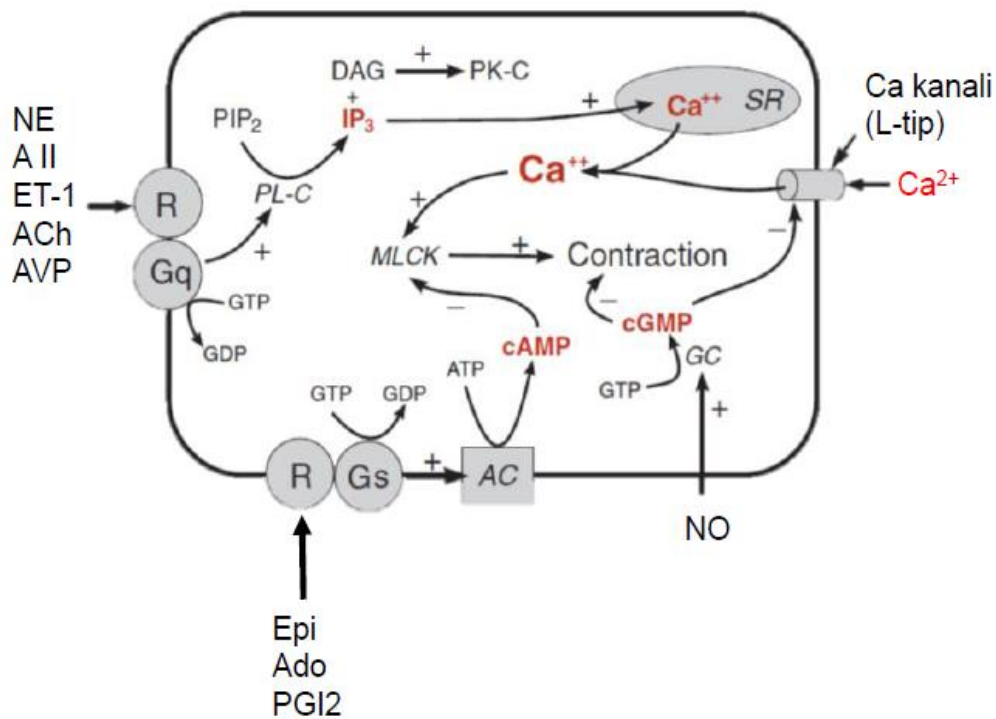
Простацкилин (*PGI<sub>2</sub>*), један од чланова фамилије простагландина, синтетише се у ендотелним ћелијама из арахидонске киселине помоћу ензима циклооксигеназе (Jaffe & Weksler 1979). Он представља моћан вазодилататор, а поред тога је и инхибитор агрегације тромбоцита (Klabunde 2012). Његову синтезу стимулишу аденозин и NO, али и бројне друге супстанце, тако да ово једињење игра и секундарну улогу у вазодилаторним ефектима (Klabunde 2012). Ову улогу остварује механизмом који подразумева активацију ензима аденилат циклазе у глатко-мишићним ћелијама чиме се повећава интраћелијска концентрација цикличног аденозин монофосфата (*cAMP*, енгл. *cyclic adenosine monophosphate*) што доводи до релаксације ових ћелија (Klabunde 2012).

Ендотелин-1 је моћан вазоконстриктор који синтетишу ендотелне ћелије помоћу ендотелин-конвертујућег ензима (*ECE*, енгл. *by endothelin-converting enzyme*) који се налази на њиховим мембранама (Kohan et al. 2011). Његову синтезу и ослобађање стимулишу ангиотензин II, вазопресин, тромбин, цитокини, реактивне врсте кисеоника, али и истезање крвних судова (тзв. „*shear stress*“) (Klabunde 2012). Овај вазоконстрикторни пептид се везује за рецепторе на глатко-мишићним ћелијама и стимулише синтезу инозитол трифосфата (*IP<sub>3</sub>*) чија повишена концентрација стимулише ослобађање калцијума из саркоплазматичног ретикулума што на крају резултује контракцијом глатко-мишићних ћелија (Klabunde, 2012).

Још један вазоактивни фактор пореклом из ендотела је *EDHF* чији хемијски идентитет још увек није утврђен, али је познато да стимулише хиперполаризацију и релаксацију глатко-мишићних ћелија (Klabunde 2012).

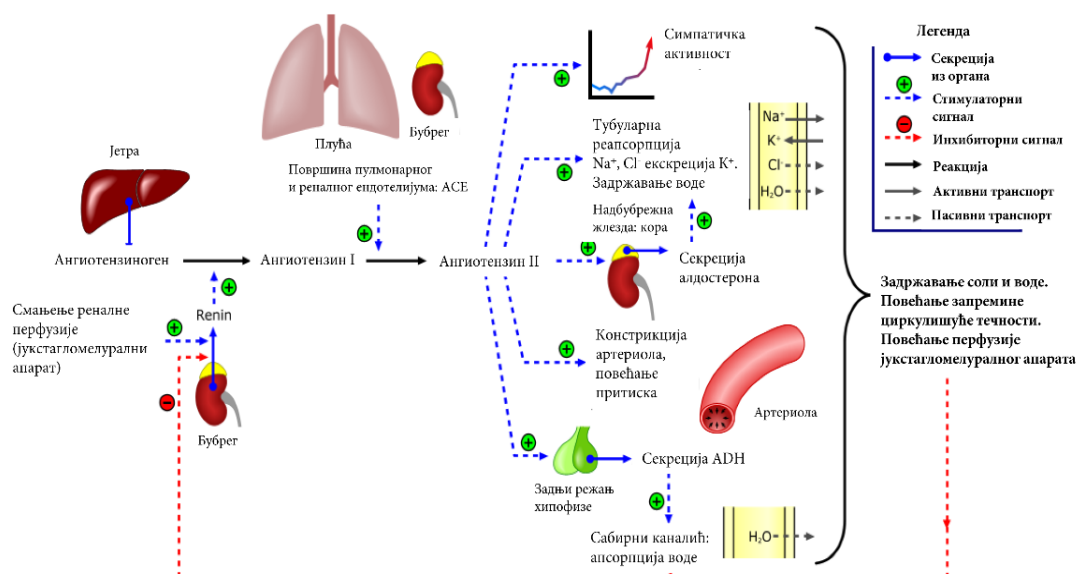
### **1.1.2.3. Ренин-ангиотензин-алдостерон систем**

Ренин-ангиотензин-алдостерон систем представља кључни ендокрини механизам контроле притиска и волумена укупне циркулишуће течности у организму. Ренин је ензим који се секретује у јукстагломеруларном апарату бубрега у условима смањене перфузије гломерула или смањеног унос соли, али такође и као одговор на појачану активност симпатичког нервног система (Beever et al. 2001). Ренин у циркулацији врши конверзију ангиотензиногена пореклом из јетре у декапептид ангиотензин I (Paul et al. 2006). Он се затим помоћу ангиотензин-конвертујућег ензима (*ACE*, енгл. *angiotensin-converting enzyme*), мембранског протеина који се највише експримира на ендотелним ћелијама плућне циркулације, конвертује у октапептид ангиотензин II (Paul et al. 2006). Ангиотензин II се сматра главним ефекторним пептидом ренин-ангиотензин-алдостерон система који има директну вазоконстриктивну улогу, коју остварује везујући се за  $AT_1$  рецепторе глатко-мишићних ћелија (Paul et al., 2006). Уз то, ангиотензин II стимулише и секрецију алдостерона, кортикостероидног хормона пореклом из коре надбубрежне жлезде, који подстиче реапсорпцију воде и натријума у бубрезима (Mehta & Griendling 2007). На овај начин ангиотензин II и посредно, преко стимулације секреције алдостерона и пораста волумена циркулишуће течности, додатно доприноси порасту притиска (Hall 2003). Такође, ангиотензин II стимулише и лучење вазопресина, хормона који такође врши стимулацију реапсорпције воде у бубрезима (Keil et al. 1975). Поред поменутог циркулишућег, системског ангиотензина II, последњих година значајан број студија је потврдио присуство



**Слика 1.1.** Рецептори и сигнални путеви који учествују у регулацији контракције глатко-мишићних ћелија. *R*, рецептор; *Gs*, стимулаторни *G*-протеин; *Gq*, *G*-протеин везан за фосфолипазу *C*; *PL-C*, фосфолипаза *C*; *AC*, аденил циклаза; *PIP<sub>2</sub>*, фосфатидилинозитол 4,5-бифосфат; *IP<sub>3</sub>*, инозитол трифосфат; *DAG*, диацил глицерол; *PK-C*, протеин киназа *C*; *SR*, саркоплазматични ретикулум; *MLCK*, киназа лаког ланца миозина; *Ado*, аденозин; *PGI<sub>2</sub>*, простациклин; *Epi*, епинефрин; *NO*, азот моноксид; *GC*, гуанил циклаза; *AII*, ангиотензин II; *ET-1*, ендотелин-1; *NE*, норепинефрин; *ACh*, ацетилхолин; *AVP*, аргинин вазопресин; *GDP*, гуанозин дифосфат; *GTP*, гуанозин трифосфат; *ATP*, аденозин трифосфат; *cAMP*, циклични аденозин монофосфат; *cGMP*, циклични гуанозин монофосфат (Klabunde 2012)

свих компоненти ренин-ангиотензин система и у различитим органима (срцу, бубрезима) (Paul et al. 2006), тако да локално синтетисан ангиотентин II такође доприноси регулацији крвног притиска.



Слика 1.2. Ренин-ангиотензин-алдостерон систем (Ариа Рад, 2006 доступно на: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a2/Renin-angiotensin-aldosterone\\_system.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a2/Renin-angiotensin-aldosterone_system.png), датум приступа 3.3.2017.)

#### 1.1.2.4. *Остали механизми регулације крвног притиска*

Каликреин-кининоген-кинин систем је још један ендокрини систем који има улогу у регулацији крвног притиска. Компоненте овог система су локализоване у срцу и васкуларном ткиву, а чине га фамилија ензима (каликреини), супстрати ових ензима (протеини кининогени и кинини) и олигопептиди настали разградњом кининогена од стране каликреина (Sharma, Uma, Noor, & Rahman, 1996; Sharma, 2006). За васкуларну хомеостазу кључан елемент овог система је брадикинин који у

интеракцији са својим рецепторима врши регулацију крвног притиска тако што доводи до вазорелаксације, пада укупног периферног васкуларног отпора и екскреције натријума из бубрега (Sharma, 2006). Брадикинин је укључен у медијацију и модулацију ренин-ангиотензин-алдостерон система, као и вазодилататора као што су простагландини, простациклини и NO (Sharma 2009).

Поред тога, аутономни нервни систем такође учествује у контроли и регулацији крвног притиска. Састоји се из симпатичког и парасимпатичког система и, између осталог, врши регулацију крвног притиска преко регулације минутног волумена срца и укупног периферног васкуларног отпора (Guyenet 2006; Mohrman & Heller 2014). Симпатички систем преко  $\alpha$ -адренергичних рецептора и трансмитера доводи до констрикције крвних судова, док преко  $\beta$ -адренергичних рецептора утиче на срце и крвне судове тако што повећава фреквенцу срца и доводи до вазодилатације (Guyenet 2006).

### **1.1.3. Оксидативни стрес и антиоксидативна заштита**

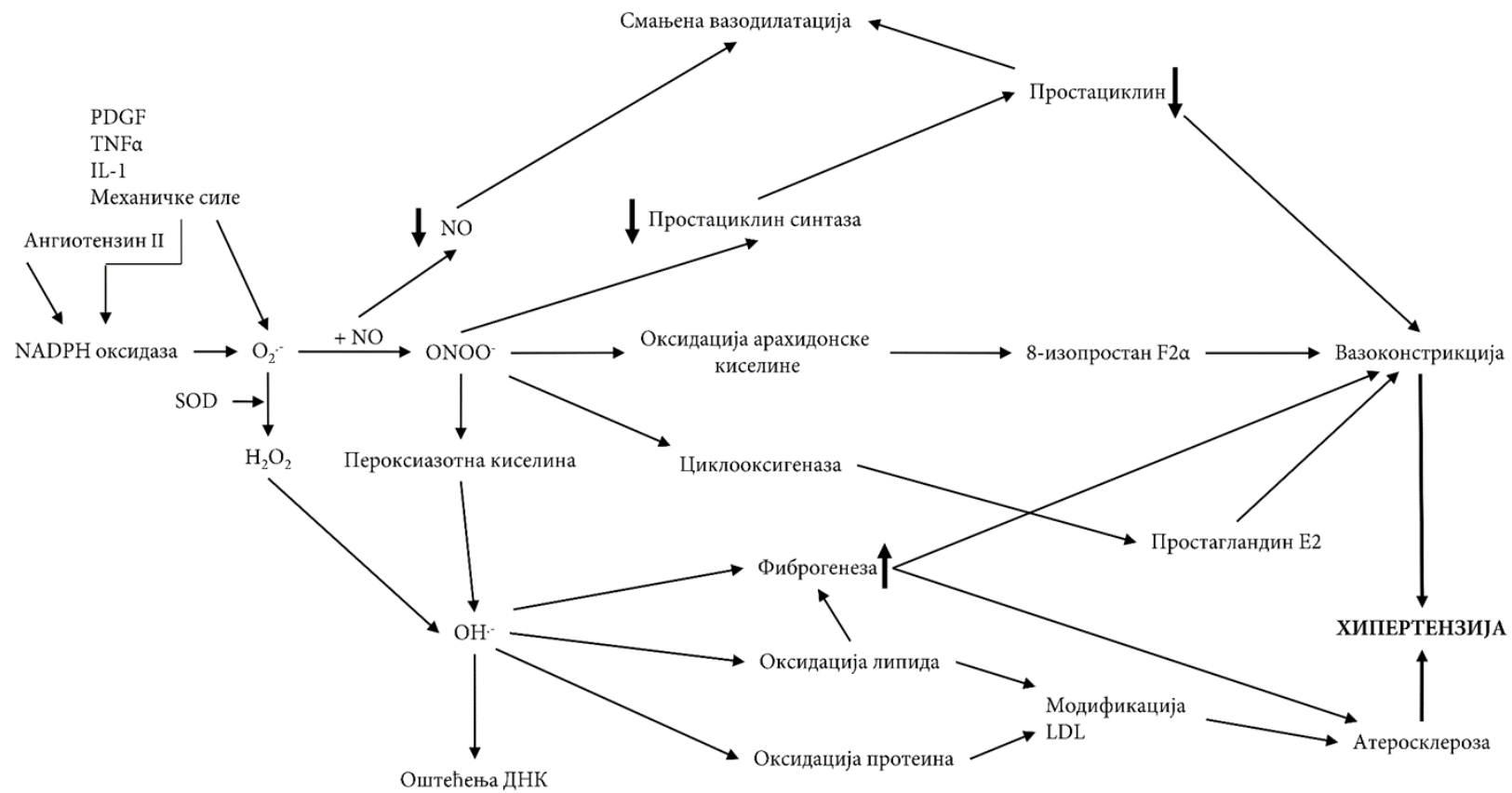
Стање хипертензије се сматра, између осталог, и стањем перманентног оксидативног стреса (Redón et al. 2003). Оксидативни стрес је резултат неравнотеже између настанка реактивних врста кисеоника и азота и њихове неадекватне неутрализације (Ju et al. 2012). Још увек није разјашњено да ли је оксидативни стрес узрок или последица хипертензије, али се свакако сматра да оксидативни стрес може значајно да допринесе даљем напредовању хипертензије, као и настанку оштећења органа као последице хипертензије (Redón et al. 2003).

Реактивне врсте кисеоника и азота су снажни модулатори васкулатурне дилатације и констрикције, а доводе и до структурног ремоделовања зидова крвних судова (Briones & Touyz 2010). Висока реактивност кисеоничних и азотних радикала доводи до неутралисања NO-а, формирања вазоконстриктивних липидних пероксида, оксидације тетрахидробиоптерина ( $BH_4$ , коензима NOS ензима),

---

активације проинфламаторних транскрипционих фактора, стимулације синтезе фактора раста, као и активације матриксних металопротеиназа које доводе до фиброзе, што има за последицу структурне промене зидова крвних судова (Briones & Touyz 2010). Све претходно поменуто има за резултат дисфункцију ендотела, повећање реактивности глатко-мишићних ћелија и ремоделовање зидова крвних судова (Briones & Touyz, 2010). Поменуте промене доводе до повећања укупног периферног васкуларног отпора што може довести до пораста крвног притиска (Sáez & Redon 2003).

У реактивне врсте кисеоника се убрајају супероксидни радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ), хидроксилни радикал ( $OH^{\cdot}$ ), перокси радикали ( $ROO^{\cdot}$ ), алкокси радикали ( $RO^{\cdot}$ ), водоник пероксид ( $H_2O_2$ ), хипохлораста киселина ( $HClO$ ), пероксинитрити ( $ONOO^{\cdot}$ ) и алдехиди (Kohen & Nyska, 2002). Извори реактивних врста кисеоника могу бити егзогени (зрачење, загађење ваздуха, пушење, ксенобиотици итд.) и ендогени (Kohen & Nyska, 2002). Ендогени извори реактивних врста кисеоника су бројни и ту спадају разни ензимски системи, митохондрије током синтезе аденозин трифосфата ( $ATP$ , енгл. *adenosine triphosphate*), али и бројне ћелије имуног система (неутрофили, моноцити и лимфоцити) које у стању инфламације производе реактивне врсте кисеоника као одговор имуног система на инфекцију (Kohen & Nyska, 2002).

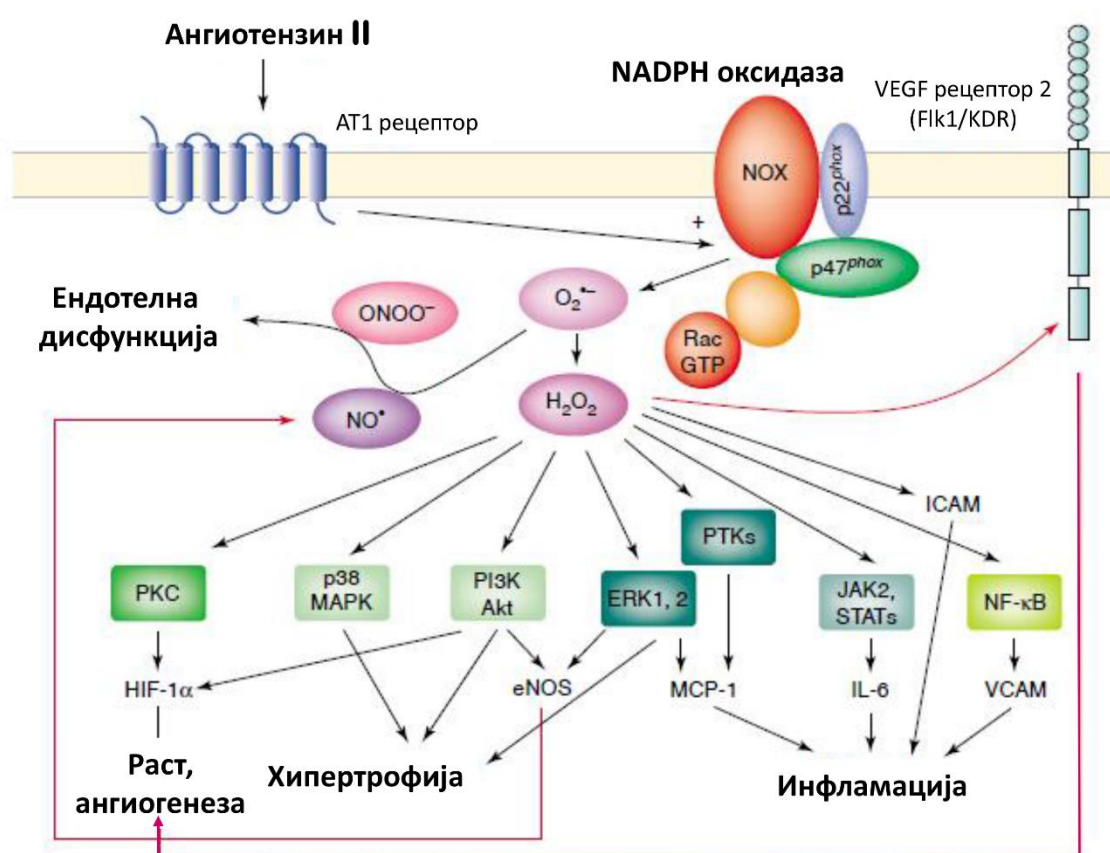


Слика 1.3. Механизам оксидативног стреса у хипертензији (Sáez & Redon 2003)



### 1.1.3.1. Супероксидни радикал

Од реактивних врста кисеоника, за патофизиологију хипертензије је најзначајнији супероксидни радикал који у крвним судовима настаје активношћу ензима *NADPH* оксидаза, *COX*, као и неактивне *NOS* (Briones & Touyz, 2010). Наиме, *NADPH* оксидазе се у хипертензији сматрају кључним извором супероксидног радикала јер поред самог формирања радикала, ови ензими су у стању и да стимулишу друге ензиме који генеришу реактивне врсте кисеоника и да тако додатно допринесу



Слика 1.4. Везивање ангиотензина II за  $AT_1$  рецептор и активација васкуларне *NADPH* оксидазе. *NOX*,  $p22^{phox}$ ,  $p47^{phox}$  и *Rac GTP*, субјединице *NADPH*; *eNOS*, ендотелна *NO* синтаза;  $O_2^{\cdot-}$ , супероксидни радикал;  $H_2O_2$ , водоник пероксид;  $ONOO^-$ , пероксинитрит;  $NO$ , азотни моноксид; *PKC*, *p38 MAPK*, *PI3K Akt*, *ERK 1* и *2*, *PTKs*, *JAK2*, *STATs*, *NF-κB*, *HIF-1α*, *MCP-1*, *IL-6*; *VCAM*, *ICAM* и *VEGF*, специфични молекули који учествују у преносу ћелијских сигнала (Cai et al. 2003).

формирању истих (Harrison, Gongora, Guzik, & Widder, 2007). Најзначајнији пут активације *NADPH* оксидаза је везивање ангиотензина II за  $AT_1$  рецепторе на ћелијским мембранама глатко-мишићних ћелија (Montezano, Nguyen Dinh Cat, Rios, & Touyz, 2014) (Слика 1.4.). Поред тога, овај радикал се синтетише и од стране *NOS* ензима у случају смањене биорасположивости  $BH_4$  као последице његове оксидације пероксинитритима, и/или у случају смањене биорасположивости *L*-аргинина (Briones & Touyz, 2010; Brown & Bicknell, 2001). Супероксидни радикал преко неколико различитих механизма доприноси хипертензији. Посредно, доприноси хипертензији тако што учествује у формирању других слободних радикала, редукујући  $Fe^{3+}$  јоне до  $Fe^{2+}$  јона који, затим, са водоник пероксидом у Фентоновој реакцији доводе до формирања врло токсичног хидроксилног радикала (Kohen & Nyska, 2002).



Такође, супероксидни радикал доприноси хипертензији и директно због свог високог афинитета према молекулу *NO*. Наиме, супероксидни радикал реагује са *NO*, због чега долази до смањења биорасположивости овог вазодилататора (Taddei et al. 2003). Поред тога, у реакцији супероксидног радикала са *NO* формира се пероксинитрит који испољава токсична својства и негативно утиче на хомеостазу васкулатуре (Nakazono et al. 1991). Такође, дисмутацијом супероксидног радикала, настаје водоник пероксид који се сматра токсичним чак и у ниским концентрацијама јер лако пролази кроз ћелијске мембране и у ћелији доводи до оксидације липида и протеина, ослобађања гвожђа, али и формирања хидроксилног радикала и хипохлорасте киселине који даље могу да доведу до ћелијских оштећења (Halliwell et al. 2000; Kohen & Nyska 2002).

### 1.1.3.2. Хидроксилни радикал

Најреактивнијим радикалом биолошких система се сматра хидроксилни радикал који има велики афинитет према бројним органским молекулима као што су липиди, протеини, ДНК, аминокиселине, шећери, али и према металима и неорганским једињењима (Kohen & Nyska, 2002). Овај радикал настаје у већ поменутој Фентоновој реакцији која представља једно од основних објашњења за настанак оксидативних оштећења у ћелији:



Улога овог радикала је кључна у процесу оксидације липида биолошких мембрана која се сматра једним од основних обележја оксидативног стреса (Ayala et al. 2014).

### 1.1.3.3. Антиоксидативна заштита

Ћелије су се током еволуције снабделе бројним механизмима који спречавају формирање и омогућавају неутрализацију реактивних врста кисеоника, као и уклањање оштећења насталих оксидативном активношћу ових реактивних врста. Од механизма ендогеног порекла који имају значајну улогу у процесима спречавања настанка оштећења изазваних реактивним врстама кисеоника, значајно је напоменути ензиме антиоксидативне заштите, као и антиоксидансе мале молекулске масе ендогеног и егзогеног порекла (витамини, глутатион, билирубин и др.) (Harrison et al. 2007).

Групу ензима антиоксидативне заштите чине супероксид дисмутаза (*SOD*, енгл. *superoxide dismutase*), каталаза (*CAT*, енгл. *catalase*), глутатион пероксидаза (*GSH-Px*, енгл. *gluthatione peroxidase*) и глутатион редуктаза (*GR*, енгл. *gluthatione reductase*) (Lee et al. 2003).

Фамилија *SOD* ензима је хетерогена и бројна, али је заједничка особина ензима из ове фамилије дисмутација супероксидног анјона до водоник пероксида (Matés 2000):



Токсични производ ове реакције, водоник пероксид, затим бива преведен у воду и молекуларни кисеоник активношћу *CAT* и/или *GSH-Px*. Каталаза своју каталитичку активност врши на седећи начин (Zhan et al. 2004):



Своју каталитичку улогу у неутралисању водоник пероксида *GSH-Px* остварује уз оксидацију два молекула глутатиона (*GSH*) (Matés 2000):



Улога *GR* је такође значајна јер она врши редукцију оксидованог глутатиона (*GSSG*) и тако доприноси регенерисању овог важног антиоксиданса (Andersen et al. 1997).

Поред ензимског система антиоксидативне заштите, важну улогу у детоксикацији и неутралисању реактивних врста кисеоника играју и већ поменути антиоксиданси мале молекулске масе. Ова једињења могу да неутралишу реактивне врсте кисеоника директно, али и индиректно - хелирањем јона метала, па тако онемогућавају одвијање Фентонове реакције и формирање већ поменутог хидроксилног радикала (Kohen & Nyska, 2002). Антиоксиданси мале молекулске масе могу да буду ендогеног или егзогеног порекла, а најзначајнија су: глутатион, мокраћна киселина, хистидин, карнозин и билирубин од ендогених, али и витамини Ц, Е и А, β-каротен, бројна фенолна једињења пореклом из биљака, незасићене масне киселине и друга једињења која спадају у групу егзогених антиоксиданаса (Matés et al. 1999; Fang et al. 2002).

## 1.2. Фенолна једињења

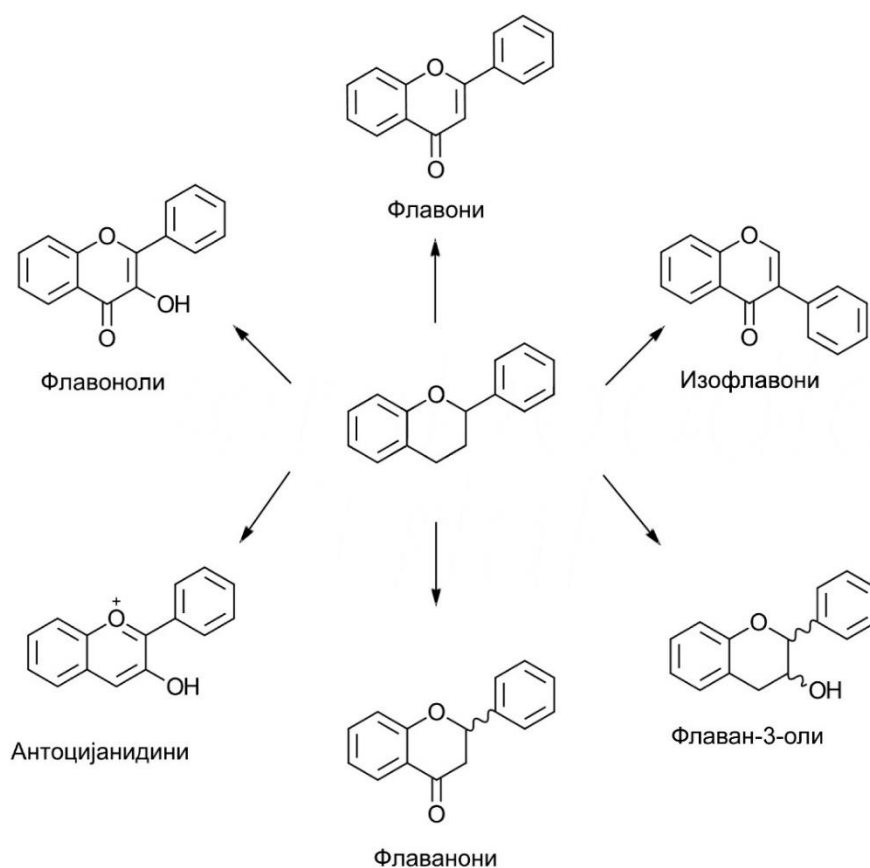
Фенолна једињења представљају секундарне метаболите биљака које се синтетишу и акумулирају у условима стреса (неадекватна осветљеност, температура, мањак нутријената, воде, биолошки стресори – бактерије, гљивице, вируси) (Cheynier et al. 2013). Њихова основна улога је заштита од неповољних спољних фактора (инсеката, бактерија, вируса и гљивица), али и одређивање сензорних карактеристика (боја, укус и аstringентност), као и учешће у гермитивним процесима (Reis Giada 2013). По хемијској структури ова једињења су карактеристична по томе што имају бар један ароматични прстен и деле се на флавоноиде и нефлавоноиде и најчешће се јављају у гликозилованом облику, везана за протеине, а тек ретко као агликони (Del Rio et al. 2013). Постоје бројни докази да дугорочна, умерена конзумација хране богате овим једињењима има благотворно дејство на људско здравље, како код здравих, тако и код особа оболелих од хроничних болести као што су кардиоваскуларна обољења, дијабетес типа II, али и различити облици карцинома (Del Rio et al., 2013). Сматра се да ова једињења своје позитивне ефекте на здравље остварују делујући првенствено као антиоксиданси (Reis Giada 2013).

### 1.2.1. Флавоноиди

Флавоноиди су секундарни метаболити биљака који представљају класу фенолних једињења најприсутнијих у храни биљног порекла (Reis Giada 2013; Spina et al. 2008). Бројне студије спроведене последињих пар деценија које су се бавиле испитивањем утицаја флавоноида на здравље људи су показале да конзумација хране богате овим једињењима има благотворно дејство (Acosta-Estrada et al. 2014; Del Rio et al. 2013). Флавоноиди су полифенолна једињења са 15 C атома ( $C_6-C_3-C_6$ ) која се састоје од два ароматична прстена и једног хетероцикличног пиранског прстена (Слика 1.5.) (Barclay et al. 2003). Ова једињења су често гликозилована, а обично су локализована

у ћелијским вакуолама и/или ћелијском зиду (Antolovich et al. 2000; Spina et al. 2008) и то највише у епидермису лишћа и у опни плода (Crozier et al. 2009). Ова једињења спадају у групу антиоксиданаса, па тиме имају важну улогу у неутралисању реактивних врста кисеоника (Proestos et al. 2006). Деле се у 13 подкласа од којих су најзначајније (Del Rio et al., 2013):

- Флавоноли представљају најприсутнију подкласу флавоноида (не синтетишу их само алге и гљиве). Најпознатији представници ове подкласе су кемферол, кверцетин, изорамнетин и мирицетин. За њих је карактеристична гликозилација и коњугација на позицијама 5, 7, 3', 4' и 5'.
- Флавоноли нису претерано распрострањени. Најпознатији представници ове подкласе су апигенин и лутеолин. Јављају се хидроксиловани, метиловани и О-и С- гликозиловани.
- Флаванони су присутни у цитрусном воћу хидроксиловани, гликозиловани и О-метиловани. Најпознатији представници су хесперидин и нарингенин.
- Флаван-3-оли који су обично негликозиловани и јављају се у форми мономера ((+)-катехин и (-)-епикатехин), олигомера и полимера (кондензовани танини тзв. проантоцијанидини).
- Антоцијанидини су подкласа флавоноида која је најприсутнија у воћу и цвећу, одговорна за њихову плаву, црвену и љубичасту боју. Најпознатији представници су малвидин, цијанидин, пеонидин и др.



Слика 1.5. Најважније подкласе флавоноида

### 1.2.2. Фенолне киселине

Фенолне киселине спадају у групу фенолних једињења која се јављају у биљкама и своју основну улогу остварују у њиховој физиологији и метаболизму (Reis Giada 2013). Укључене су у процесе размножавања, а поред тога, ова једињења покрећу и одбрамбене механизме биљака у стресним ситуацијама (Saibabu et al. 2015). У ћелији, најчешће су везане за компоненте ћелијског зида као што су угљени хидрати и протеини (Reis Giada 2013). Сматра се да ова једињења у људској исхрани имају првенствено антиоксидативну улогу јер спречавају оштећења која могу бити изазвана слободним радикалима (Lafay & Gil-Izquierdo 2008). Фенолне киселине, као класа фенолних једињења, спадају у групу нефлавоноида и деле се на две подкласе: деривате бензојеве ( $C_6-C_1$ ) и деривате циметне киселине ( $C_6-C_3$ ) (Giada,

2013). Од деривата бензојеве киселине најпознатија је гална киселина која се најчешће јавља у комплексним естрима са шећерима (галотанини), али и салицилна и ванилинска киселина (Reis Giada 2013), док је међу дериватима циметне киселине најпознатија кафена киселина чији 3-О-, 4-О- и 5-О- естри са хином киселином представљају хлорогенску киселину и њене изомере (криптохлорогенску и неохлорогенску киселину) (Del Rio et al., 2013). Поред хине киселине, кафена киселина гради естре и са малном и шикиминском киселином (Vermerris & Nicholson 2008). Такође, у деривате циметне киселине спадају и прилично распрострањене кумаринска и ферулна киселина (Giada, 2013). Сматра се да фенолне киселине чине чак 1/3 укупних фенолних једињења присутних у људској исхрани и да, као и флавоноиди, имају благотворно дејство на здравље (Crozier et al. 2009).

### 1.3. *Urtica dioica* L.

*Urtica dioica* L. (коприва или жара) је вишегодишња, зељаста биљка која припада роду *Urtica* и фамилији Urticaceae (Jančić 2013). Ова биљка има велики индустријски и пољопривредни значај првенствено због тога што сваки део биљке (корен, лист и стабло) може бити коришћен као индустријска сировина, као и због чињенице да се лако узгаја (Di Virgilio et al. 2015). Она је космополитска биљка која расте скоро свуда (Josifović 1977). Нема велике захтеве за светлошћу и топлотом, а успешно се гаји на скоро свим типовима земљишта, мада најбоље успева на земљиштима богатим органским материјама у распадању (Stepanović & Radanović 2011). Све ово је вероватно један од разлога што је од недавно коприва у фокусу различитих истраживања што је резултирало растућим бројем пројеката и научних радова који се баве копривом као извором влакана за текстилну индустрију, као и богатим извором биолошки активних једињења (Di Virgilio et al., 2015). Поред тога што је атрактивна са становишта индустријске експлоатације, ова биљка има и еколошки значај јер при узгоју има ниске захтеве за биоцидима, а такође, на терену на ком се



узгаја може да ублажи ефекте претходног претераног ђубрења земљишта фосфатним и азотним ђубривима (Dreyer et al. 2002). Коприва са етнофармаколошког и медицинског становишта има вишемиленијумски значај јер се кроз историју користила у третману разних болести, првенствено артритиса, реуматизма и мишићне парализе (Upton 2013). Још су стари Египћани и Грци користили свежу коприву директно прислањајући биљку на болна места и на тај начин „загревали“ артритичне и реуматичне удове и ублажавали болове (Upton 2013). Данас се у медицинске сврхе највише користе лист (*Urticae folium*) и корен (*Urtica radix*) ове биљке (Stepanović & Radanović 2011) и то углавном као додатак исхрани код особа са уринарним инфекцијама, реуматичним стањима, алергијама, бенигном хиперплазијом простате, и бројним другим патолошким стањима (Upton 2013).

### **1.3.1. Морфолошке карактеристике**

Ризом коприве је гранат и округлао, док је надземно стабло усправно, просто, четворострано и покривено кратким чекињама и дугачким жарним длакама, висине од 30 до 150 cm (Josifović 1977). Листови су јајастог или ланцетастог облика, наспрамни, по три у пршљену (Josifović 1977). Ивице листа су грубо, тестерасто назубљене и са обе стране посуте полеглим, кратким длакама, али и жарним трихомама (Josifović 1977). Цветно стабло носи само мушке или женске цветове (Josifović 1977). Мушке цвасти су усправне, док су женске, посебно уколико су бочне, дуже и обично висе (Josifović 1977). Семе је јако ситно, смеђе до црне боје, има тврду семењачу, због чега је клијање отежано (Stepanović & Radanović 2011). Подземна стабла презимљавају без оштећења, а развој надземних делова почиње у рано пролеће (Jančić 2013).

### 1.3.2. Хемијска једињења карактеристична за биљку *Urtica dioica* L.

Хемијска једињења по чијем садржају је позната коприва су серотонин (Collier & Chesher 1956), ацетилхолин, хистамин и леукотриени која при додиривању листа доводе до познатог „жарећег“ ефекта (Czarnetzki et al. 1990). Корен је богат церамидима и за ову биљку специфичним лектином УДА (*Urtica dioica* L. аглутинин) (Upton 2013). Деривати кафене и малне киселине (Yıldız et al. 2008) су такође заступљени у надземном делу биљке. Лишће коприве садржи широк спектар једињења, нпр. хлорогенска киселина је присутна у знатној количини, као и катехин (Yıldız et al. 2008), а утврђено је и присуство кумарина скополетина (Sajfrtová et al. 2005). Бројне студије потврђују и присуство других флавоноида, протеина, минерала, масних киселина, терпена и витамина (Guil-Guerrero et al. 2003; Upton 2013). Када је у питању акумулација биоактивних једињења у свежој биљци, утврђено је да се садржај укупних фенола и аскорбинске киселине временом смањује (Nencu et al. 2013). Такође, утврђено је да хемијски састав биљке варира у зависности од географског порекла и земљишта на ком биљка расте, као и да постоје разлике у саставу гајене и дивље биљке (Pinelli et al. 2008).

Масне киселине су хранљиви принципи присутни у лишћу коприве који су од великог нутритивног значаја. Истраживање извора масних киселина је у последње време јако актуелно с обзиром на чињеницу да оне играју значајну улогу у људском метаболизму и да испољавају благотворно дејство код кардиоваскуларних и других хроничних обољења (Simopoulos 2000). Резултати студије која се бавила испитивањем садржаја масних киселина у коприви са територије Шпаније указују на висок садржај  $\alpha$ -линолеинске киселине која је најприсутнија у лишћу, док је семе богатије линолном киселином (Guil-Guerrero et al. 2003). Поред тога, у овој студији је утврђено да су палмитинска и стеаринска киселина присутне у свим испитиваним деловима биљке (листу, корену, стабљици и семену), с тим што је палмитинска киселина присутна у нешто већој количини него стеаринска. Када су у питању

мононезасићене масне киселине, ова студија је показала присуство палмитолеинске, олеинске и мале количине гадолеинске киселине, док је друга анализа екстракта листа коприве показала присуство линолне, линоленске, палмитинске, олеинске и стеаринске киселине (Bombardelli & Morazzoni 1997).

Коприва садржи 5-6% протеина у свежој, и 23-24% протеина у сувој биљци од чега око 70% чине сварљиви протеини (Upton, 2013). Процент протеина варира у зависности од дела биљке који се испитује (Sajfrtová et al. 2005). Поред тога, лектин УДА карактеристичан за ризом коприве, идентификован је јоноизмењивачком хроматографијом у чак 6 изомерних облика (Van Damme et al. 1988). Показано је и да ова биљка садржи калцијум, магнезијум, цинк, бакар, манган, и кобалт у различитим деловима биљке (Rosnitschek-Schimmel 1985). Анализа коприве са подручја Мађарске указује на присуство елементата попут астата, кадмијума, гвожђа, алуминијума, бора, баријума, хрома, молибдена, титанијума и ванадијума (Szentmihályi et al. 2006), док су *Mahlangeni* и сар. (2016) показали присуство никла и олова у лишћу коприве.

Лишће коприве је богато витаминима као што су: витамин Ц (20-60 mg/100 g суве материје), витамини Б групе и витамин К (0,16-0,64 mg) (Upton 2013). Анализом различитих делова биљке утврђено је присуство 9 каротеноида, од којих преовлађују лутеин,  $\beta$ -каротен и њихови изомери, а присутни су и неоксантин, виолаксантин и ликопен, при чему је садржај каротеноида већи у младом у односу на зрело лишће (Guil-Guerrero et al. 2003).

Хлорофил је један од најзаступљенијих састојака коприве и чини 0,08–0,3% свежег, и 0,6–1% сувог листа (Upton 2013). Садржај хлорофила је већи у младом лишћу (Kukrić et al. 2012) и зависи од метаболизма биљке, хемијског састава терена на коме биљка расте, и интензитета светлости којој је биљка изложена (Phyllis & Panisset 1934). Наткритичном екстракцијом пигмената листа коприве утврђен је садржај

хлорофила а и хлорофила б од 73 и 100 mg/100 g с.м. (суве материје) (Sovová et al. 2004). Поред тога, у овој биљци су идентификоване и неке карбоксилне киселине мање молекулске масе као што су мравља и сирћетна киселина (Upton, 2013).

#### 1.3.2.1. Флавоноиди биљке *Urtica dioica* L.

Proestos и сар. (2006) су коришћењем HPLC-UV/VIS методе (енгл. *high-performance liquid chromatography-ultraviolet/visible spectrophotometry*) у метанолном екстракту коприве утврдили присуство (+)-катехина и (-)-епикатехина. Поређењем састава флавоноида дивље и гајене коприве, у листу обе су детектовани лутеолин и епигалокатехин галат док је кверцетин био присутан само код дивље (Spina et al., 2008). У квалитативном и квантитативној анализи састава фенолних једињења коприве узорковане са различитих географских подручја Турске, у скоро свим узорцима је потврђено присуство нарингенина, рутина, катехина, мирцетина, кверцетина и кемферола (Otles & Yalcin 2012). Изорамнетин је пронађен у листу узорака из Анталије као и у листу биљке пореклом из Самсуна (Otles & Yalcin, 2012). При HPLC-DAD (енгл. *high-performance liquid chromatography-diode array detector*) анализи фенолних једињења коприве, из метанолног екстракта листа изоловани су рутин, кемферол-3-О-рутинозид, кверцетин-3-О-рутинозид и изорамнетин-3-О-гликозид (Pinelli et al. 2008). У студији која је имала за циљ идентификацију различитих антиоксиданаса у метанолним екстрактима биљака које се користе у медицинске сврхе, у екстракту листа кориве су идентификовани рутин и изокверцетин (Eharchou et al. 2006; Orčić et al. 2014). Поред тога, Orčić и сар. (2014) су потврдили и присуство кемферол-3-О-глукозида у екстрактима листа коприве. При проучавању имуномодулаторних ефеката гликозида флавоноида, из листа коприве такође је изолован рутин, али и кемферол-3-О-рутинозид и изорамнетин-3-О-рутинозид (Akbaý et al. 2003), док су Komes и сар. (2011) у инфузу листа детектовали само мирцетин и изорамнетин. Поменути једињења су детектована и у 80%-тном метанолном екстракту листа коприве, а такође је утврђено и присуство

изокверцетина, као и кверцетин диглукозида (Grevsen, Fretté, & Christensen, 2008). При анализи састава фенолних једињења у воденим екстрактима листа коприве, детектовани су нарингенин и нарингин (Ince et al. 2012).

#### **1.3.2.2. Фенолне киселине биљке *Urtica dioica* L.**

Од фенолних киселина у коприви са подручја Грчке, идентификоване су гална, ферулна, сиригинска и *p*-хидроксибензојева киселина, од чега је гална била најприсутнија (Proestos et al., 2006). Присуство хлорогенске, *p*-кумаринске, ферулне и *t*-циметне киселине је детектовано у воденом екстракту коприве, а након хидролизе, у истом екстракту детектована је и кафена киселина (Komes et al. 2011). Слично, у метанолном екстракту надземних делова коприве детектоване су хлорогенска и ферулна киселина (Exarchou et al. 2006). У студији која се бавила анализом садржаја фенолних једињења у листу коприве са територије Турске, детектоване су такође *p*-кумаринска, ферулна, сиригинска, кафена и хлорогенска, али и ванилинска, елагна и фумарна киселина (Ogles & Yalcin, 2012). Слично, *HPLC/MS* (енгл. *high-performance liquid chromatography/mass spectrometry*) анализа 80%-тног метанолног екстракта листа коприве је поред кафене и ферулне, утврдила и присуство 5-*O*-кафеоил хине, ферулне и *p*-хидроксибензојеве киселине (Orčić et al. 2014). Grevsen и сар. (2008) су такође у 80%-тном метанолном екстракту детектовали деривате кафене (3-*O*-кафеоил хину и 2-*O*-кафеоил малну), али и 5-*O*-ферулоил хину киселину. Кафена киселина и њени деривати (хлорогенска и 2-*O*-кафеоил мална киселина) су, поред *p*-кумаринске киселине, идентификовани и у листу коприве са подручја Италије (Pinelli et al., 2008). Иста студија је показала да кафена киселина и њени деривати чине више од 70% укупних фенола у листу, како дивље, тако и гајене коприве.

### 1.3.2.3. Садржај укупних фенола, антиоксидативни капацитет и способност екстраката листа *Urtica dioica* L. да хелирају јоне метала

Садржај фенолних једињења у биљном екстракту значајно зависи од полазног биљног материјала, као и од параметара екстракције (Tsao & Deng 2004), о чему сведоче бројни литературни подаци.

Тако су Ince и сар. (2012) у воденим екстрактима листа коприве добијеним различитим екстракционим методама (микроталасна екстракција, ултразвучна екстракција и мацерација) добили садржај укупних фенола (*TP*, енгл. *total phenolic*) од 14,4 до 25,7 mg GAE/g с.м. листа. Слично, мацерација листа коприве у трајању од 48 h са метанолом је резултовала приносом *TP* од 24,1 mg GAE/g с.м. листа и антиоксидативном активношћу одређеном *DPPH* (енгл. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) тестом од 70,8% (Pourmorad et al. 2006). У Соклет екстракцији листа коприве са метанолом у трајању од 72 h где је екстракт након тога фракционисан, *TP* принос је у зависности од фракције тестираног узорка (метанол, етил ацетат, хлороформ, диетил етар или бутанол) износио од 17,2 до 36,4 mg GAE/g с.м. листа (Chahardehi et al. 2009). У истој студији је показано да највишу антиоксидативну активност одређену *DPPH* тестом имају бутанолна (62,5%) и етилацетатна (62,2%) фракција екстракта, док је највећи садржај полифенола код коприве забележен у бутанолној фракцији (36,4 mg GAE/g с.м.). Етанолни екстракти коприве, претходно третиране инхибитором декарбоксилазе или стимулатором биосинтезе фенола, добијени мацерацијом у трајању од 72 h су имали нешто нижи *TP* принос који је износио од 7,6 до 9,6 mg GAE/g с.м. листа, док је антиоксидативна активност мерена *DPPH* методом износила од 15,12 до 26,7% (Hudec et al. 2007). Слично, ултразвучна екстракција листа коприве, као и мацерација уз загревање, су резултовале *TP* приносом од 6,9 mg GAE/g с.м. листа (Proestos et al., 2006). *TP* садржај у екстракту листа коприве добијен при 30-о минутној мацерацији са метанолом на собној

температури је износио 40,6 mg GAE/100 g с.м. екстракта (Spina et al., 2008), док су Kukrić и сар. (2012) из етанолног екстракта припремљеног коришћењем ултразвука добили принос од 208,4 mg GAE/g с.м. екстракта. У истој студији је вршено и испитивање антиоксидативне активности екстракта применом *FRAP* (енгл. *ferric reducing antioxidant power*), *DPPH* и *TEAC* (енгл. *trolox equivalent antioxidant capacity*) тестова, и показано је да овај екстракт, при поређењу са стандардним антиоксидантима као што су витамин Ц, бутил хидрокситоулен (*BHT*, енгл. *butylated hydroxytoluene*), бутил хидроксианизол (*BHA*, енгл. *butylated hydroxyanisole*), има умерену антиоксидативну активност (Kukrić et al. 2012). У студији у којој је вршено детаљно испитивање антиоксидативне активности воденог екстракта коприве, тиоцијанатном методом је утврђено да екстракт показује дозно зависну и значајно већу моћ инхибиције пероксидације линолне киселине у односу на  $\alpha$ -токоферол (витамин Е) (Gülçin et al. 2004). Такође, исти екстракт је испољио значајно већи потенцијал инхибиције формирања супероксидног радикала у односу на *BHA* и  $\alpha$ -токоферол, приближно исту способност неутралисања хидроксилног радикала као и *BHA*, као и значајно већи капацитет хелирања јона метала него сва три тестирана антиоксиданса, док је *DPPH* тестом утврђено да има исту антиоксидативну активност као и *BHA*. Özkan и сар. (2011) у студији која се бавила одређивањем антиоксидативне активности и садржаја фенолних једињења у биљкама које се користе у традиционалној медицини у Турској, су у метанолном екстракту коприве измерили *TP* садржај од чак 332,19 mg GAE/g листа, док је антиоксидативна активност мерена *DPPH*, *TEAC* и *FRAP* методама износила 10,03 mmol TE/g с.м. листа, 40,59 mmol TE/g с.м. листа, 38,65 mmol AAE/g с.м. листа, а способност хелирања јона гвожђа 3,05 mmol EDTA/g с.м. листа. При испитивању приноса и антиоксидативне активности екстраката добијених различитим екстракционим техникама (ултразвучна екстракција, мацерација и Сокслет екстракција), вредности приноса *TP* су се кретале од 450,81

до 539,27 mg GAE/g с.м. екстракта, док су опсеги антиоксидативне активности износили од 0,11 до 0,34 mg/mL за *DPPH* антиоксидативну активност, и од 30,16 до 47,71 mg Fe<sup>2+</sup>/g с.м. екстракта за *FRAP* антиоксидативну активност (Stanojević et al. 2016).

#### 1.4. Екстракција

Екстракција представља дифузиони процес у ком се из неког почетног, најчешће биљног материјала, врши „извлачење“ корисних компоненти коришћењем одговарајућег екстракционог средства и представља главни корак у изоловању биоактивних молекула из биљака (Vuleta 2012). У овом процесу се добијају екстракти који по дефиницији Европске фармакопеје 7.0 представљају течне, получврсте и чврсте конзистенције које се обично добијају из осушених биљних дрога (Ph. Eur. 2011). Екстракцијом се постиже одвајање фармаколошки активних компоненти од инертних и неактивних материјала присутних у биљној сировини (Vuleta 2012). Ово се постиже коришћењем различитих екстракционих средстава који селективно растварају различите компоненте, као и применом различитих метода екстракције. При томе, избор методе и екстракционог средства зависи од природе материјала из ког се екстрахује, као и од једињења која се екстрахују (Tsao & Deng 2004). При екстракцији долази до преласка активних компоненти у екстракционо средство, а динамика овог преласка зависи од (Vuleta 2012):

- коефицијента дифузије,
- контактне површине дроге и екстракционог средства,
- концентрационог градијента,
- времена екстракције,
- температуре.

Сви утицаји који могу да делују на неки од поменутих фактора, могу да утичу и на квалитет и брзину екстракције (Vuleta 2012). Због разлика у биљном матриксу, локализацији активних компоненти које се екстрахују, али и хемијских и физичко-



хемијских особина ових компоненти, немогуће је имати универзални приступ екстракцији. Неки од основних фактора који утичу на принос неке екстракције су пре свега, екстракциона метода, екстракционо средство, трајање екстракције, температура, однос дрога/екстракционо средство, степен уситњености дроге, рН вредност, мешање и други (Tsaο & Deng 2004).

#### 1.4.1. Методе за екстракцију фенолних једињења

Природа ћелијског матрикса и локализација компоненти играју важну улогу и при екстракцији фенолних једињења, па је потребно узети у обзир да су фенолна једињења углавном највише присутна у вакуолама и ћелијском зиду, док у цитоплазми скоро да их уопште и нема (Antolovich et al. 2000). Поред тога, ова једињења се у ћелији јављају слободна, али и везана за протеине и угљене хидрате што се такође мора узети у обзир при избору услова екстракције (Lichtenthaler & Schweiger 1998). Повећање температуре и трајања екстракције обично доводи до повећаног приноса фенолних једињења (Davidov-Pardo et al. 2011; Biesaga & Pyrzyn 2013). Међутим, при екстракцијама на повишеним температурама, као и у случају дуготрајних екстракција, може да дође и до њихове оксидације и ензимске разградње (Davidov-Pardo et al. 2011; Biesaga & Pyrzyn 2013). Слично, смањење односа дрога/екстракционо средство обично повећава принос фенолних једињења, али и овај фактор захтева оптимизацију како би се потрошња растварача минимализовала (Khoddami et al. 2013). Утицај екстракционог средства је од изузетне важности за принос екстракције и условљен је првенствено физичко-хемијским карактеристикама једињења која се екстрахују (Tura & Robards 2002). Фенолна једињења имају константе дисоцијације у широком опсегу вредности ( $pK_a$  вредност се креће од 8 до 12), а исто тако и поларност (партициони коефицијент вода/уље се креће од  $6 \times 10^{-14}$  до 1,5) што драстично утиче на избор екстракционог средства (Rodis et al. 2002). Од екстракционих средстава, за екстракције фенолних киселина и флавоноида најчешће се користе вода, метанол, етанол, ацетон и

хлороформ, али и мешавине воде и поменутих органских раставарача (Khoddami et al. 2013). У литератури се за екстракцију деривата хидроксициметне киселине и флавоноида најчешће спомиње водено-метанолни растварач (Shi et al. 2005) са уделом метанола од 50 до 80% (Tsao & Deng 2004). Коришћење одређеног процента воде у екстракционом средству је за екстракцију фенолних једињења пожељно, пошто су ова једињења најчешће у гликозилованом облику што им у одређеној мери повећава поларност (Acosta-Estrada et al. 2014; Khoddami et al. 2013; Tsao & Deng 2004).

Екстракција фенолних једињења из биљних сировина врши се применом различитих стандардних екстракционих техника: инфузија, декокција, мацерација, Соклет екстракција и екстракција уз загревање и рефлукс (Ivancheva & Stantcheva 2000; Figueirinha et al. 2008; Khoddami et al. 2013). Поред тога, могу се користити још и ултразвучна екстракција (*UAE*, енгл. *ultrasound assisted extraction*), наткритична екстракција (*SFE*, енгл. *supercritical fluid extraction*), микроталасна екстракција (*MAE*, енгл. *microwave-assisted extraction*), екстракција са применом инфрацрвеног зрачења (*IRAE*, енгл. *infrared-assisted extraction*), екстракција са повишеним притиском и температуром (*ASE*, енгл. *accelerated solvent extraction*), екстракција са водом у субкритичном стању (*SWE*, енгл. *subcritical water extraction*) и екстракција са применом високог хидростатичког притиска (*HHPE*, енгл. *high hydrostatic pressure extraction*) (Dai & Mumper, 2010; Khoddami et al., 2013; Tsao & Deng, 2004). Све ове методе имају своје предности и ограничења које је неопходно узети у обзир при доношењу одлуке о томе која метода ће бити коришћена. Инфузија и декокција, традиционалне технике за припрему биљних екстраката, због тога што се заснивају на преливању кључалим екстракционим средством и кувањем дроге, могу да доведу до термичке разградње фенолних једињења (Khoddami et al. 2013). Друге стандардне екстракционе технике, као што су Соклет екстракција и екстракција уз загревање и рефлукс, се доста често користе за екстракцију фенолних једињења јер су

једноставне, док је потребна опрема за извођење ових екстракција приступачна (Khoddami et al. 2013). Међутим, ове технике захтевају велике запремине екстракционог средства, а због примене високе температуре и дугог трајања екстракције (обично 90°C у току неколико сати) такође може доћи до деградације фенолних једињења (Chua 2013; Khoddami et al. 2013). Изузетно распрострањена метода екстракције је мацерација која подразумева да се биљни материјал заједно са екстракционим средством држи на собној температури од пар минута до неколико дана са или без мешања (Khoddami et al. 2013). Ова метода је практична са становишта опреме и извођења, али због дугог трајања екстракције може да дође до смањења приноса фенолних једињења због њихове деградације (Khoddami et al., 2013). У последње време је за екстракцију фенолних једињења постала актуелна примена *MAE* методе због тога што скраћује трајање екстракције, смањује потрошњу екстракционог средства, као и због тога што повећава ефикасност екстракције (Tsao & Deng 2004). Ова техника представља комбинацију: примена класичних екстракционих средстава са једне, и микроталаса са друге стране (Camel 2001). Суштина ове екстракционе методе је у томе да микроталаси стимулишу кретање молекула растварача са диполним моментом и доводе до загревања, бубрења и пуцања ћелија биљног матрикса што на крају има за последицу ослобађање ћелијског садржаја (Camel 2001). У последње време се у екстракцији фенолних једињења користи и *ASE* екстракциона метода која се раније углавном користила за уклањање разних контаминената (Suchan et al. 2004), а која подразумева примену екстракционог средства под високим притиском и температуром (Piñeiro et al. 2004). Међутим, недостатак и ове методе је опасност од термичке деградације фенолних једињења (Tsao & Deng 2004). Поред поменутих техника, у екстракцији фенолних једињења своје место је нашла и *HNPE* која се заснива на коришћењу изузетно високог хидрауличког притиска (од 1000 до 8000 bar) који повећава пермеабилност биљног матрикса и ослобађање ћелијског

садржаја (Shouqin et al. 2005). Основни недостатак ове методе је изузетно скупа опрема (Khoddami et al. 2013). Метода која омогућава екстракцију фенолних једињења без примене високе температуре је *SFE* и она постаје све атрактивнија за екстракцију фенолних једињења (Junior et al. 2014). Метода се заснива на коришћењу гасова који се при одређеним вредностима притиска и температуре, преводе у суперкритично стање при чему задржавају и својства гасова (дифузивност), али добијају и својства течности (добре растварачке карактеристике) (Junior et al. 2014). Најчешће коришћен суперкритични флуид је  $\text{CO}_2$  који је нетоксичан, еколошки прихватљив и хемијски инертан (Tsao & Deng 2004). Недостатак ове методе је скупа опрема, и чињеница да је  $\text{CO}_2$  неполаран па је неопходно коришћење и одређене количине метанола како би се постигла екстракција (Chang et al. 2001; Lin et al. 1999). Још једна еколошки прихватљива и брза техника је *SWE* која се заснива на коришћењу воде у субкритичном стању (температуре од 100 до 347°C и притиска од 10 до 60 bar) (Khoddami et al. 2013). Недостак ове технике је скупа опрема и чињеница да се овом методом екстрахују искључиво поларна једињења (Khoddami et al. 2013).

Поред поменутих метода, посебно место у екстракцији фенолних једињења има и *UAE*. Ова метода се заснива на примени ултразвука (фреквенције веће од 16 GHz) у току екстракције биљног материјала са неким од екстракционих средстава (Vilkhu et al. 2008). Примена ултразвука побољшава екстракцију узрокујући феномен кавитације која представља формирање, раст и колапс мехурова паре растварача (Vilkhu et al. 2008). Наиме, ултразвук доводи до наизменичног раста и пада притиска у екстракционом средству. Када дође до пада притиска, стварају се услови за формирање кавитационих мехурова (Soria & Villamiel, 2010). Ови мехурови у наредних пар циклуса промене притиска расту да би, када постану нестабилни, дошло до њихове имплозије која доводи до локалног раста температуре до чак 5000 K и притиска до 1000 atm (Barbosa-Canovas, G. V., Rodriguez 2002). Због свега

поменутог, у зони кавитације се јављају микро-струје и турбуленција што може значајно да повећа трансфер масе и побољша квалитет и принос екстаракције (Soria & Villamiel, 2010). Поред тога, део акустичне енергије ултразвука прелази у топлотну енергију па долази до загревања биљног материјала и екстракционог средства (Soria & Villamiel, 2010). Са становишта коришћене биљне дроге, употреба ултразвука је пожељна јер доводи до њене хидратације, бубрења и повећања пора ћелијског зида и, на крају, до његовог комплетног разарања (Vinatoru 2001). Ултразвучна екстракција је јако ефикасна метода јер због поменутих ефеката убрзава процес екстракције (Soria & Villamiel, 2010). Недостатак ове методе је што при ослобађању велике количине енергије као последице колапса кавитационих мехурова долази до формирања јако реактивних хидроксилних радикала који могу да доведу до оксидације фенолних једињења (Soria & Villamiel, 2010).

#### **1.4.2. Литературни преглед параметара и метода екстракција активних једињења из биљке *Urtica dioica* L.**

За потребе карактеризације састава и испитивања антиоксидативног потенцијала компонената листа коприве, бројне групе аутора примењивале су различите методе и параметре екстракције.

У табели 1.1. приказан је преглед доступних литературних података о екстаркционим параметрима и методама коришћеним за екстракцију фенолних једињења из различитих делова биљке *Urtica dioica* L.

**Табела 1.1.** Табеларни приказ параметара и метода екстракција активних једињења из биљке *Urtica dioica* L.

Биљни материјал	Метода	Параметри екстракције	Референца
		1 g дроге, 4,5 mL етанола, 30 минута, собна температура	
лист коприве	мацерација уз мешање		(Spina et al., 2008.)
лист коприве	екстракција уз рефлукс	0,3 g дроге, 50%-тни етанол, 30 минута	(Nencu et al. 2013)
		1,5 g дроге, 3x25 mL, 70%-тни етанол, собна температура, рН=3,2 НСООН	
лист и стабљика коприве	мацерација		(Pinelli et al. 2008)
		2 g дроге, 200 mL кључале воде, 5-10 минута, собна температура	
листа коприве	инфузија		(Komes et al. 2011)
		1 g дроге, 40 mL 60%-тни етанол, 5 mL 2M HCl, 2 h, 95°C	
листа коприве	екстракција уз мешање		(Komes et al. 2011)
корен, лист и стабљика коприве	мацерација уз загревање	1 g дроге, 10 mL 80%-тни метанол, 1 h, 50°C	(Otlés & Yalcin, 2012)
		дрога:екстракционо средство=3:20, 80%-тни метанол, 2 h, собна температура	
херба коприве	мацерација		(Grevsen et al. 2008)
		80%-тни метанол, дрога:екстракционо средство=1:15, 48 h, собна температура	
лист коприве	мацерација уз мешање		(Orčić et al. 2014)

Табела 1.1. (Наставак)

Биљни материјал	Метода	Параметри екстракције	Референца
херба коприве	Соклет екстракција	12h, метанол	(Exarchou et al. 2006)
лист коприве	мацерација	метанол, 40°C	(Akbay et al. 2003)
	ултразвучна	1 g дроге, 15 mL 70%-тни метанол, 105 минута (сваких 45 min екстракције додато још 5 mL	
херба коприве	екстаркација	70%-тног метанола)	(Yildiz et al. 2008)
		1 g дроге, 50 mL кључале воде, 5 min, собна	
херба коприве	инфузија	температура	(Yildiz et al. 2008)
		I Фаза (сонификација): 0,5 g дроге, 40 mL	
	сонификација,	62,5%-тни метанол, 10 mL 6 M HCl, 15 min; II	
лист коприве	екстракција уз рефлукс	Фаза (рефлукс): 90°C, 2 h	(Proestos et al. 2006)
		5 g дроге, 34,25 mL 70%-тни етанол, 72 h, собна	
корен, лист и стабљка		температура, свакодневно мућкање у трајању од	
коприве	мацерација	5 min	(Hudec et al. 2007).
лист коприве	Соклет екстракција	метанол, 72 h	(Chahardehi et al. 2009)

Табела 1.1. (Наставак)

Биљни материјал	Метода	Параметри екстракције	Референца
лист коприве	ултразвучна екстракција (30 kHz)	20 g дроге, 3x100 mL 80%-тни етанол, 5 min, 25 °C, мешање 30 min	(Kukrić et al. 2012)
коприва (цела биљка)	мацерација	однос дрога:екстракционо=1:10, метанол, 48 h	(Pourmora et al. 2006)
херба коприве	микроталасна екстракција (407 W)	вода, дрога:екстракционо средство (1:10, 1:20 и 1:30), трајање екстракције (5, 10, 15 и 20 min)	(Ince et al. 2012)
херба коприве	ултразвучна екстракција (300 W, 20 Hz)	вода, дрога:екстракционо средство (1:10, 1:20 и 1:30), трајање екстракције (5, 10, 20 и 360 min), 40 °C	(Ince et al. 2012)
херба коприве	мацерација	вода, 24 h, 40 °C	(Ince et al. 2012)
лист коприве	мацерација	дрога:екстракционо средство=1:20, 30, 50, 80 и	
лист коприве	ултразвучна екстракција (3 x 50 W и 40 kHz)	100%-тни метанол, 120 min, 25°C дрога:екстракционо средство=1:20, 50%-тни метанол, 60 min, 25°C	(Stanojević et al. 2016)
лист коприве	Соклет екстракције	дрога:екстракционо средство=1:20, 50%-тни метанол, 240 min, 77°C	(Stanojević et al. 2016)



## 1.5. Биолошки ефекти екстракта *Urtica dioica* L.

Поред врло распрострањене традиционалне употребе, бројне су студије које су показале да коприва има благотворне ефекте у третману великог броја различитих здравствених проблема код људи (Upton 2013). Тако је у клиничким студијама и/или на животињским моделима, као и у *in vitro* условима, показана антиинфламаторна и аналгетичка (Randall et al. 2008; Toldy et al. 2009; Chrubasik et al. 1997), имуномодулаторна (Akbay et al., 2003; Harput, Saracoglu, & Ogihara, 2005), диуретичка и натриуретичка (Dizaye et al. 2013; Tahri et al. 2000), хипоурикемична (Ding et al. 2005), хипотензивна (Dizaye et al. 2013; Qayyum et al. 2016; Testai et al. 2002), антиоксидативна (Toldy et al. 2005; Cetinus et al. 2005), антилипемична (Daher et al. 2006; Avci et al. 2006), антидијабетична (Bnouham et al. 2003; Das et al. 2011) и антимикробна активност (Brantner & Grein 1994; Gülçin et al. 2004), као и хепатопротективна својства у различитим хепатотоксичним моделима код животиња (Türkdoğan et al. 2003; Kanter et al. 2003).

### 1.5.1. Антихипертензивна, хипотензивна, диуретичка, натриуретичка и хипоурикемична активност

Хипотензивни ефекти екстракта ризома коприве показани су у студији која је испитивала ове ефекте код хипертензивних и нормотензивних пацова, а механизам ових ефеката је показан на изолованој пацовској и зечијој аорти (Qayyum et al. 2016). Акутна интравенска администрација екстракта ризома коприве у дозама 1, 3, 10, 30 и 50 mg/kg т.м. је довела до дозно-зависног пада средњег артеријског притиска код хипертензивних, али и код нормотензивних пацова. Такође, у истој студији, етанолна, п-хексанска, етил ацетатна и водена фракција тестираног екстракта су такође довеле до снижења притиска. Поред тога, у истој студији је у *ex vivo* испитивањима на изолованим аортама зеца и пацова показано да се механизам хипотензивног ефекта заснива на NO-зависаној вазорелаксацији, као и на

вазорелаксацији услед блокирања калцијумових канала (Qayyum et al., 2016). *Testai* и сар. (2002) су показали хипотензивне ефекте акутне интравенске примене инфузата корена коприве код пацова, а ове ефекте су приписали вазорелаксацији узрокованој ослобађањем NO-а, отварању калијумових канала и негативном инотропском ефекту. У другој студији је показано да акутна интравенска доза од 20 mg/kg т.м. инфуза листа коприве доводи до израженог пада артеријског притиска и фреквенце срца код нормотензивних пацова, док код зечева доводи до повећања диурезе и натриурезе (Dizaye et al. 2013). Студија спроведена на *Wistar* пацовима који су инфузијом примали суви инфуз надземних делова коприве у дозама од 4 и 24 mg/kg/h и фуросемид (конвенционални диуретик) у дози од 2 mg/kg/h, је показала значајан дозно-зависан пад артеријског притиска у односу на одговарајуће контролне вредности (за 15, 38 и 28%, редом) (Tahri et al. 2000). Ово је било праћено дозно-зависним повећањем диурезе (11 и 84%) и натриурезе (28 и 143%) код група које су примале поменуте две дозе екстракта коприве. Хипотензивно дејство овог екстракта коприве је након једног часа у случају ниже дозе било реверзибилно, док је у случају примене високе дозе хипотензивни ефекат био дуготрајан. Друга студија је показала повећање диурезе код пацова за 20% 6 h након акутне примене декокта коприве путем назогастричне сонде (Cáceras et al. 1987). *Legssyer* и сар. (2002) су показали да раствор осушеног инфуза надземних делова коприве, у моделу изолованог срца пацова, доводи до смањења фреквенце срца, а да у изолованој аорти долази до дозно зависног повећања васкуларног тонуса. Скополетин, кумарин присутан у коприви, дат *i.p.* у дозама 50, 100 и 200 mg/kg т.м., је довео до тренутног и дозно зависног пада концентрације мокраћне киселине у серуму код хиперурикемичних мишева, али не и код нормалних мишева (Ding et al. 2005). У истој студији је доказан и *in vitro* инхибиторни ефекат скополетина на XO, па се може закључити да скополетин смањује прекомерену синтезу мокраћне киселине и повећава њену екскрцију.

### 1.5.2. Антиоксидативни ефекти

*Toldy* и сар. (2005) су испитивали комбиноване и појединачне ефекте физичке активности (пливања) и исхране која садржи 1% листа коприве на маркере оксидативног стреса у мозгу *Wistar* пацова. Они су показали да осмонедељна исхрана обogaћена листом коприве има антиоксидативна својства и показује потенцијалано антиапоптоичко дејство у мозгу пацова. *Cetinus* и сар. (2005) су показали антиоксидативне ефекте екстракта листа коприве у моделу оштећења мишићног ткива пацова изазваног исхемијом и реперфузијом. *Özen* и *Korkmaz* (2003) су показали да третман екстрактом листа коприве доводи до повећања активности ензима антиоксидативне заштите у јетри, бубрегу и плућима мишева. Аутори су претпоставили да је виша доза одговорна за повећање активности свих ензима антиоксидативне заштите у јетри, као и за пораст активности *SOD* и *CAT* у бубрезима и плућима. Са друге стране, у истој студији је показано да је нижа доза проузроковала повећање активности *SOD* и *CAT* у бубрегу и плућима, док је у јетри дошло до повећања једино активности *SOD*. У моделу хепатотоксичности, показано је да уље семенки коприве доводи до значајног смањења липидне пероксидације, трансминаза у серуму пацова, као и до повећане концентрације глутатиона, витамина Ц, Е, β-каротена и ретинола у серуму ових експерименталних животиња (*Kanter et al.* 2003). *Özkol* и сар. (2012) су показали да шестодневни третман сувим екстрактом хербе коприве у дозама 50, 100, 200 и 400 mg/kg на дан у моделу цисплатин-индуковане хепатотоксичности, доводи до смањења липидне пероксидације и повећања активности ензима антиоксидативне заштите у јетри мишева. Поред тога, третман са све четири дозе је довео и до смањања активности *AST*, *ALT* и лактат дехидрогеназе (*LDH*, енгл. *lactate dehydrogenase*) у серуму ових мишева. У другој студији *i.p.* администрација уља семенки коприве снизила је степен липидне пероксидације, активности *AST*, *ALT* и *LDH* и повећала активност *CAT* у серуму пацова са исхемијско-реперфузивним оштећењем јетре (*Kandis et al.*

2010). У моделу  $CCl_4$ -индуковане хепатотоксичности код пацова, седмонедељни третман дозом хербе коприве од 200 mg/kg на дан довео је до повећања активности *CAT*, *SOD* и *GSH-Px* у серуму, снижења липидне пероксидације у јетри, као и снижења активности *ALT*, *AST* и *LDH* у серуму (Bitiren et al. 2010).

### 1.5.3. Утицај на липидни статус

*Daher* и сар. (2006) су показали да водени екстракт хербе коприве (150 mg/kg на дан) и у мањој мери њен петролетарски екстракт (20 mg/kg на дан), давани орално током 30 дана, доводе до значајног пада вредности укупног холестерола, *LDL* холестерола као и односа *LDL/HDL* (енгл. *high-density lipoprotein*) холестерола. Такође, у истој студији је показано да водени екстракт коприве доводи до смањења вредности триглицерида у серуму хиперлипидемичних пацова. У студији која се бавила испитивањем утицаја биљних екстраката на липидни статус пацова подвргнутих дијети са високим садржајем холестерола, је показано да водени екстракт коприве даван *per os* (100 mg/kg на дан, 30 дана) доводи до повећања серумског *HDL* за 35,2% (Avcı et al. 2006). Етанолни екстракт испитиван у овој студији је довео до снижења серумског *LDL* холестерола за 66%, као и снижења активности *AST* и *ALT* за 71,6 и 80,2%. *Alisi* и сар. (2008) су показали да третман инфузом надземних делова коприве даван *per os* у дозама 100, 200 и 300 mg/kg на дан у трајању од 41 дан доводи до значајног пада укупног холестерола, триглицерида, *LDL* и *LDL/HDL* односа. Поред тога, у истој студији све три дозе довеле су до значајног смањења активности *ALT*, *AST* и *LDH*, али и снижења билирубина у случају две веће дозе (200 и 300 mg/kg на дан). Слично, испитивање ефеката етанолног екстракта листа коприве, даваног *per os* (100 и 300 mg/kg на дан, 28 дана), је показало да обе дозе екстракта доводе до значајног снижења укупног холестерола и *LDL*, као и до смањења активности *ALT* и *AST* код хиперлипидемичних пацова (Nassiri-Asl et al. 2009). У студији која се бавила испитивањем утицаја биљних екстракта на активацију *PPAR* (енгл. *peroxisome proliferator-activated receptor*) рецептора који, између осталог, имају

важну улогу у метаболизму липида, је показано да етанолни екстракт листа коприве врши активацију ових рецептора (Rau et al. 2006).

---

## 2. Циљеви рада

Циљ овог рада је расветљавање потенцијалне улоге фенолних једињења пореклом из листа коприве (*Urtica dioica* L.) у превенцији и лечењу кардиоваскуларних обољења. Истраживања у оквиру ове тезе реализована су кроз две фазе. Активности у оквиру прве фазе су биле усмерене ка:

- оптимизацији екстракционих параметара (екстракционог средства, трајања екстракције, екстракционе методе) ради постизања максималног приноса фенолних једињења,
- хемијска карактеризација екстраката,
- одређивање антиоксидативних својстава добијених екстраката.

У другој фази су вршена *in vivo* испитивања ефеката четворонедељне примене три дозе екстракта листа коприве у експерименталном моделу есенцијалне хипертензије са циљем утврђивања:

- дозно зависних антихипертензивних ефеката,
- антиоксидативних ефеката,
- утицаја на липидни статус.

Будући да је предмет истраживања биљна врста са дугом традицијом употребе (као напитака или биљни препарат), циљ тезе је да се оптимизују параметри екстракције фенолних једињења из листа коприве, дефинише састав и деловање екстракта коприве како би се његовом конзумацијом могао осигурати довољан унос биолошки активних једињења која могу остварити позитиван утицај на људско здравље.

У оквиру ове дисертације су по први пут испитани *in vivo* ефекти хроничне примене екстракта листа коприве на крвни притисак, проток и отпор у системској и регионалној циркулацији, минутни волумен срца, фреквенцу срчаних контракција, оксидативни стрес, антиоксидативни капацитет и активности ензима антиоксидативне заштите, липидни статус и биохемијске параметре, као и експресију NOS ензима у бубрегу код пацова са урођеном хипертензијом соја Окамото-Аоки.

---

### 3. Експериментална испитивања

#### 3.1. Биљни материјал-порекло и карактеристике

Уситњен лист коприве, сушен на ваздуху, добијен је од Института за проучавање лековитог биља "Др. Јосиф Панчић" у Београду. Порекло биљног материјала је планина Јастребац, а година жетве 2013. Гранулометријске карактеристике материјала су биле: сито 0,71=28,0%, сито 0,3=70,8%, и сито 0,15=0,50%.

#### 3.2. Екстракција

##### 3.2.1. Мацерација

Коришћена је конвенционална чврсто-течна екстракција (мацерација) на мешалици. Примењен однос дрога/екстракционо средство је био 1:20. Дрога (1,25 g) је преливена са 25 mL екстракционог средства у ерленмајеру. Екстракциона средства која су коришћена су:

- 50, 75 и 96%-тни етанол (*Zorka Pharma-HEMIJA*, Шабац, Србија),
- 50, 75 и 100%-тни метанол (*Fisher Scientific*, Питсбург, Пенсилванија, САД),
- вода дејонизована системом *MilliQ system* (*Millipore*, Билерика, Масачусетс, САД),

Трајање екстракције је било различито: 30, 60 и 90 min (Слика 3.1.) на собној температури. Екстракти су након екстракције филтрирани кроз 0,45  $\mu\text{m}$  целулозни филтер (*Millipore*, Билерика, Масачусетс, САД), а филтрати допуњени до првобитне запремине одговарајућим екстракционим средством. Сви екстракти су били припремљени у трипликату.



### 3.2.2. Ултразвучна екстракција

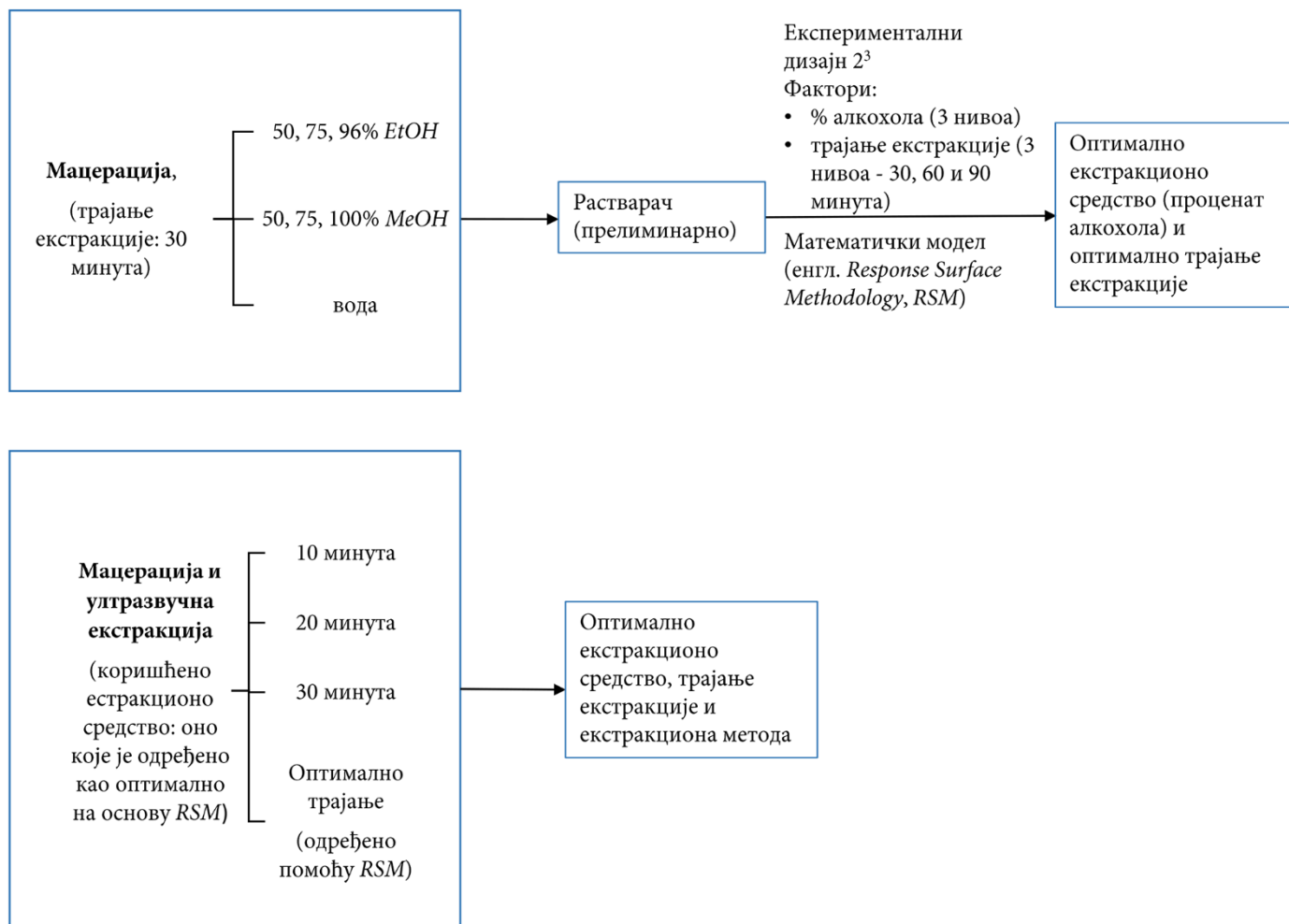
UAE је рађена на собној температури у ултразвучном купатилу *Bandelon Sonorex RK 52* (*Bandelon Electronic*, Минхен, Немачка) на фреквенцији од 35 kHz HF снаге 60 W. У ерленмајер је 1,25 g дроге преливано са 25 mL одговарајућег екстракционог средства. Утицај ултразвука је испитан при претходно одрађеним оптималним вредностима екстракционих параметара (екстракционо средство и трајање екстракције), као и при трајању екстракције од 10, 20 и 30 min (Слика 3.1.). Екстракти су након тога филтрирани кроз 0,45  $\mu\text{m}$  целулозни филтер, а филтрати допуњени до првобитне запремине одговарајућим екстракционим средством. Сви екстракти су били припремљени у трипликату.

### 3.2.3. Лиофилизација

Екстракт са највећим приносом *TP* је лиофилизован ради лакше употребе у даљим испитивањима у *in vivo* делу студије. Метанол из екстракта је упарен на ротационом упаривачу уз загревање и под сниженим притиском, након чега је екстракт замрзнут на  $-80^{\circ}\text{C}$  и на овој температури је држан 1 h. Након тога, процес лиофилизације је вршен у лиофилизатору (*Beta 1-8 Freeze Dryer, Martin Christ*, Немачка) током две фазе:

- Прва фаза: температура,  $-60^{\circ}\text{C}$ ; притисак, 0,011 bar; време 24 h
- Друга фаза: температура,  $-75^{\circ}\text{C}$ ; притисак, 0,0012 bar; време 4 h

Овако добијен сув екстракт листа коприве (*UE*) је даље коришћен за испитивање антихипертензивних и антиоксидативних ефеката, као и ефеката на липидни статус у хроничној студији на експерименталним животињама.



Слика 3.1. Шематски приказ оптимизације екстракције *TP* листа коприве

### 3.3. Метода за одређивање садржаја укупних фенола у екстрактима листа *Urtica dioica* L.

Садржај укупних фенола (*TP*) одређен је спектрофотометријски коришћењем модификоване *Folin-Chichateau* методе (Stević et al. 2010). У 1 mL 10%-тног *Folin-Chichateau* реагенса (*Merck KgaA*, Дармштадт, Немачка) додато је 200  $\mu$ L узорка. Након инкубације у трајању од 4 min, додато је 800  $\mu$ L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  концентрације 75 g/L ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , *Merck KgaA*, Дармштадт, Немачка). Након инкубације у мраку на собној температури у трајању од 2 h мерена је апсорбанца узорка на 765 nm. Раствор галне киселине (*Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД) концентрације од 0 до 100 mg/L је коришћен за припрему стандардне криве. Сва мерења су извршена у трипликату. Резултати су изражени у mg *GAE/g* с.м. (енгл. *gallic acid equivalent*) узорка.

### 3.4. Метода за одређивање садржаја укупних флавоноида у екстрактима листа *Urtica dioica* L.

Садржај укупних флавоноида је одређен спектрофотометријски на основу методе засноване на формирању комплекса са  $\text{AlCl}_3$  (Zhishen et al. 1999). У 200  $\mu$ L разблаженог екстракта је додато 60  $\mu$ L 5%-тног воденог раствора  $\text{NaNO}_2$  (*Superlab*<sup>®</sup>, Београд, Србија). Након 5 min, додато је 60  $\mu$ L 10%-тног воденог раствора  $\text{AlCl}_3$  (*Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД), и након 1 min још 400  $\mu$ L 1M  $\text{NaOH}$  (*Carlo Erba*, Милано, Италија). Након енергичног мешања, мерена је апсорбанца на 510 nm. Садржај укупних флавоноида је изражен у mg *CTE/g* с.м. (енгл. *catechin equivalent*).

### 3.5. LC/MS анализа екстраката листа коприве

LC/MS (енгл. liquid chromatography/mass spectrometry) анализа је вршена на Agilent MSD TOF уређају повезаним са Agilent 1200 series HPLC уређајем и RR Zorbax Eclipse

*Plus* C18 колоном (1,8  $\mu\text{m}$ , 150 x 4,6 mm). Мобилна фаза А је била 0,2%-тни водени раствор мравље киселине, док је мобилна фаза Б била ацетонитрил. Инјекциона запремина је износила 2  $\mu\text{L}$ , а елуирање колоне је вршено при протоку мобилне фазе од 1,4 mL/min градијентом према следећој шеми: 0-1,5 min, 5% Б; 1,5-26 min, 5-95% Б; 26-35 min, 95% Б; 35-36 min, 95-5% Б. Масени спектар је одређен коришћењем *Agilent ESI-MSD TOF* система. Као гас за сушење коришћен је азот протока 12 L/min, притисак распршивања је био 45 psig, док је температура гаса за сушење била 350°C. За *ESI* анализу коришћени су следећи параметри: капиларни напон од 4000 V, фрагментор од 140 V, скимер 60 V, *Oct RF V* 250 V, за негативне и позитивне режиме рада. Опсег маса који је коришћен је био од 100 до 2000 *m/z*. Подаци су обрађени помоћу софтвера *Molecular Feature Extractor*.

### 3.6. HPLC-DAD анализа

Фенолна једињења у испитиваним узорцима су одређена поређењем ретенционих времена, као и апсорпционих спектра непознатих пикова (распон таласних дужина од 200 до 400 nm) са истим вредностима референтних стандарда. *HPLC-DAD* анализа је урађена на *Agilent 1200 Series HPLC* уређају (*Agilent Technologies*, Пало Алто, Калифорнија, САД) опремљеним са *Lichrospher*<sup>®</sup> 100 RP 18е хроматографском колоном. Мобилна фаза А је била 0,17%-тна мравља киселина, док је као мобилна фаза Б коришћен ацетонитрил. Инјекциона запремина је била 10  $\mu\text{L}$ , проток 0,8 mL/min са програмом градијента протока мобилне фазе од 0-53 min 0-100%-тни Б. Време трајања анализе је износило 55 min. Свака анализа је рађена у трипликату.

### 3.7. Методе за одређивање антиоксидативног капацитета екстраката листа *Urtica dioica* L.

#### 3.7.1. FRAP метода

FRAP метода је коришћена за оцену антиоксидативног капацитета самог екстраката као и плазме (Benzie & Strain 1996). Заснована је на промени апсорбанце узорка до које долази у присуству антиоксиданса услед редукције  $\text{Fe}^{3+}$  јона у  $\text{Fe}^{2+}$  јон који, затим, формира комплекс са TPTZ (енгл. 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine) који апсорбује електромагнетно зрачење таласне дужине 593 nm. Укратко, FRAP реагенс је припремљен мешањем 25 mL 300 mM ацетатног пуфера (pH 3,6), 2,5 mL 10 mM TPTZ (2,4,6-трис(2-пиридил)-s-триазин, Sigma-Aldrich, Сент Луис, Мисури, САД) раствореног у 40 mM HCl („Zorka Pharma“ а.д., Шабац, Србија) и 2,5 mL 20 mM  $\text{FeCl}_3$  (Sigma-Aldrich, Сент Луис, Мисури, САД). Затим је 70  $\mu\text{L}$  узорка додато у 2,1 mL FRAP реагенса и све инкубирано 5 min на собној температури. Апсорбанца је мерена на 593 nm. За припрему стандардне криве је коришћен водени раствор  $\text{FeSO}_4$  са опсегом концентрација 0-100  $\mu\text{M}$  (Sigma-Aldrich, Сент Луис, Мисури, САД). Резултати су изражени у mmol  $\text{Fe}^{2+}$ /g с.м. и mmol  $\text{Fe}^{2+}$ /L, за екстракте и плазму, редом. Сва мерења су извршена у трипликату.

#### 3.7.2. DPPH метода

DPPH метода је коришћена за одређивање антиоксидативног капацитета екстраката (Silva et al. 2005). При томе се користи DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилхидразил, Sigma-Aldrich, Сент Луис, Мисури, САД) који представља стабилан слободни радикал. Заснива се на смањењу апсорбанце раствора овог радикала на 517 nm услед његове редукције антиоксиданасима из узорка. Укратко, у 1,4 mL 80  $\mu\text{M}$  метанолног раствора DPPH додато је 100  $\mu\text{L}$  разблаженог екстракта, а апсорбанца је након инкубације у трајању од 30 min на собној температури у мраку

мерена на 517 nm. Сва мерења су вршена у трипликату. Процент инхибиције је израчунат на основу формуле:

$$\% \text{ инхибиције} = \frac{A_0 - A_i}{A_0} 100\%$$

Где је  $A_0$  апсорбанца контроле,  $A_i$  апсорбанца узорка. Резултати су изражени као  $EC_{50}$  вредност (mg/mL) која представља концентрацију узорка неопходну да се изврши неутрализација 50% почетне концентрације *DPPH* радикала.

### 3.7.3. TEAC метода

TEAC антиоксидативна метода се заснива на способности редукције слободног радикала  $ABTS^{*+}$ , формираног у реакцији *ABTS*-а (енгл. *2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)*) и  $K_2S_2O_8$  (Re et al. 1999). Ова реакција резултује смањењем апсорбанце на 734 nm. Дакле, у 2 mL 7 mM *ABTS* (2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин)-6-сулфонска киселина, *Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД) је додато 2,45 mM  $K_2S_2O_8$  (*Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД) и добијени раствор је остављен да стоји у мраку током 12-16 h. Након тога је раствору  $ABTS^{*+}$ , разблаженом са 0,5 M фосфатним пуфером (pH 7,4) или етанолом, подешена апсорбанца на вредност  $0,7 \pm 0,02$  на таласној дужини од 734 nm. У стаклену кивету је у 2 mL  $ABTS^{*+}$  раствора додато 20  $\mu$ L екстракта или плазме. Након инкубације на 30°C током 6 min, мерен је пад вредности апсорбанце. Стандардна крива је формирана коришћењем *Trolox*<sup>®</sup>-а (( $\pm$ )-6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина, *Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД). Резултати су изражени у  $\mu$ mol TE/g с.м. екстракта (енгл. *trolox equivalent*), или mmol TE/L плазме. Сва мерења су извршена у трипликату.

### 3.7.4. Способност хелирања јона гвожђа

Способност хелирања јона гвожђа је одређена методом која се заснива на смањењу апсорбанце комплекса Fe(II)-ферозина (Dinis et al. 1994). Ова метода је коришћена

са малим модификацијама тако што је у 450  $\mu\text{L}$  1,5 mM  $\text{FeCl}_2$  (*Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД) и 1,8 mL 0,385 mM ферозина (3-(2-пиридил)-5,6-дифенил-1,2,4-триазин-*p,p'*-дисулфонска киселина, *Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД) додато 50  $\mu\text{L}$  узорка. Све је енергично измешано па је апсорбанца мерена након 10 min на таласној дужини од 562 nm. Резултати су изражени у  $EC_{50}$  (mg/mL) вредности која представља концентрацију узорка неопходну да се изврши хелирање 50% јона гвожђа. Сва мерења су извршена у трипликату.

### 3.7.5. Способност неутралисања супероксидног радикала

Мерење способности неутралисања супероксидног радикала се заснива на смањењу апсорбанце *NBT* (енгл. *nitroblue tetrazolium*) који бива редукован од стране супероксидног радикала насталог у реакцији *NADH* (енгл. *nicotinamide adenine dinucleotide*) и феназин метасулфата (Yamaguchi et al. 2000). Наиме, 0,4 mL 235  $\mu\text{M}$  раствора *NBT* (*Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД) у 50 mM фосфатном пуферу (pH 7,4) је помешано са 0,4 mL 700  $\mu\text{M}$  раствора *NADH* (*Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД) раствореног у истом пуферу и 0,4 mL узорка. Реакција је започета додавањем 0,4 mL 180  $\mu\text{M}$  раствора феназин метасулфата (*Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД) у 50 mM фосфатном пуферу (pH 7,4). Раствор је затим инкубиран на собној температури током 5min, након чега је мерена апсорбанца на 560 nm. Резултати су изражени у  $EC_{50}$  (mg/mL) вредности која представља концентрацију узорка неопходну да се изврши неутрализација 50% супероксидног радикала. Сва мерења су вршена у трипликату.

## 3.8. Дизајн експеримента и *RSM* модел

Коришћен је пун факторијални експериментални дизајн  $2^3$  (2 - број фактора, 3 - број нивоа у оквиру сваког фактора) са девет експерименталних тачака са циљем одређивања утицаја трајања екстракције и процента метанола у екстракционом средству на принос *TP* у екстрактима. Испитивана су два фактора:

- проценат метанола ( $X_1$ : 50, 75 и 100%-тни метанол),
- трајање екстракције ( $X_2$ : 30, 60 и 90 min).

Сваки фактор је кодиран у три нивоа помоћу следеће једначине:

$$X_i = (x_i - x_o) / \Delta x_i$$

Где је  $X_i$  кодирана вредност фактора,  $x_i$  стварна вредност фактора,  $x_o$  стварна вредност фактора у централној тачки, а  $\Delta x_i$  разлика између стварне вредности фактора и вредности фактора у централној тачки (Табела 3.1.).

**Табела 3.1.** Стварне и кодиране вредности независних фактора: трајања екстракције и процента метанола (% MeOH) коришћених у експерименталном дизајну

Фактори	Вредности	
	Стварне вредности	Кодиране вредности
	фактора	фактора
% MeOH, $X_1$	50	-1
	75	0
	100	1
Трајање екстракције, min $X_2$	30	-1
	60	0
	90	1



Зависна променљива је била  $TP$  садржај који је мерен у свакој експерименталној тачки. За моделовање утицаја процента метанола и трајања екстракције на  $TP$  садржај, коришћен је полином другог степена:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{\substack{i=1 \\ i < j}}^{n-1} \sum_{j=2}^n \beta_{ij} X_i X_j$$

где  $X_1, X_2, \dots, X_n$  представљају факторе,  $Y$  зависну променљиву, а  $\beta_0, \beta_i, \beta_{ii}, \beta_{ij}$  коефицијенте регресије за одсечак, линеарне, квадратне и мешовите елементе полинома. Репрезентативност коришћеног математичког модела је одређена на основу коефицијента детерминације ( $R^2$ ).

### 3.9. Испитивање *in vivo* ефеката третмана са екстрактом листа

#### *Urtica dioica* L.

##### 3.9.1. Етичка изјава

Спровођење огледа на животињама реализовано је у складу са законом о доброти животиња ("Службени гласник", Бр. 41/09) уз прибављено позитивно мишљење Етичке комисије Института за медицинска истраживања, Универзитета у Београду и одобрење о спровођењу огледа Управе за ветерину, Министарства пољопривреде и заштите животне средине Републике Србије (бр. 323-07-02449/2014-05).

##### 3.9.2. Експериментални протокол

У овој студији је коришћено 50 спонтано хипертензивних пацова (енгл. *SHR - spontaneously hypertensive rats*) мушког пола, старости 6 месеци телесне масе око 300 g. Животиње су узгојене у Институту за медицинска истраживања, Универзитета у Београду и храњене су стандардном храном за лабораторијске пацове (Ветеринарски завод, Суботица, Србија). Хипертензија је потврђена индиректним мерењем крвног притиска на репној артерији применом уређаја за индиректно

регистровање крвног притиска (*Physiograph Four, Narco Bio Systems Inc., Хјустон, Тексас, САД*).

Пацови су подељени у 5 експерименталних група које су у току четири недеље свакодневно, гастричном сондом (гаважом), примале:

- *SHRC* - 0,5 mL воде (контролна група),
- *SHR+L* - лосартан 10 mg/kg т.м. (конвенционални антихипертензив, позитивна контролна група),
- *SHR+UE10* - 10 mg/kg т.м. екстракта *UE*,
- *SHR+UE50* - 50 mg/kg т.м. екстракта *UE* и
- *SHR+UE200* - 200 mg/kg т.м. екстракта *UE*.

Дозе лосартана и *UE* су биле растваране у 0,5 mL воде.

По завршетку третмана, животиње су анестезиране натријум-пентобарбиталом (35 mg/kg т.м., *i.p.*) како би се извршиле хируршке интервенције неопходне за хемодинамска мерења и узорковање ткива и органа за даље анализе.

### 3.9.3. Хемодинамска мерења

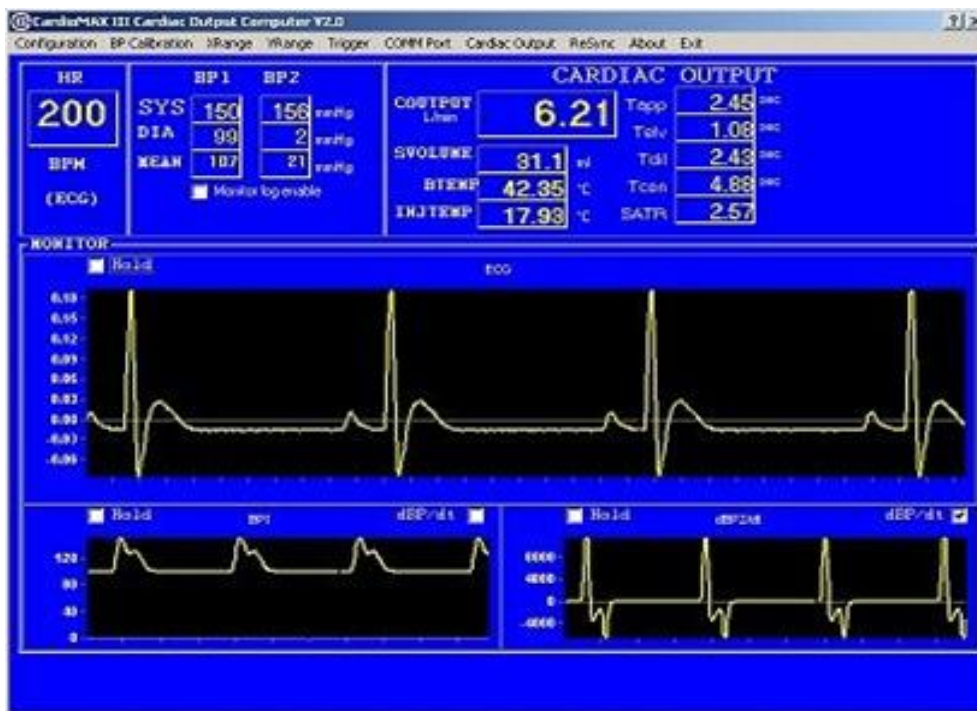
Извршена је канулација леве феморалне артерије са *PE-50* катетером (*Clay-Adams Parsippany, Њујорк, Њујорк, САД*) који је преко електро-механичког претварача повезан са *9800TCR Cardiomax III-TCR* уређајем (*Columbus Instruments, Коламбус, Охајо, САД*) (Слика 3.2.). Мерења су систолни крвни притисак, дијастолни крвни притисак, средњи артеријски притисак и фреквенца срца. Минутни волумен срца је одређен методом термодилуције. За ове потребе, вршена је канулација десне југуларне вене са *PE-50* катетером ради инјектовања хладног физиолошког раствора (око 8°C), а у леву каротидну артерију постављен је термосензор повезан са *9800TCR Cardiomax III-TCR* уређајем. Други термосензор, такође повезан са уређајем, је био уроњен у хладан физиолошки раствор (око 8°C). Преко катетера у југуларној вени нагло је у циркулацију убризгавано 0,2 mL хладног физиолошког раствора.

Термосензор у каротидној артерији је регистровао промену температуре крви са временом на основу чега је софтвер вршио израчунавање вредности минутног волумена срца. Минутни волумен срца је изражен на јединицу телесне масе (mL/min/kg). Укупни периферни васкуларни отпор протоку крви израчунаван је дељењем вредности средњег артеријског притиска (регистрованог у тренутку мерења минутног волумена срца) са вредношћу минутног волумена срца нормираном на јединицу телесне масе, и овај параметар је изражен у јединици mmHg min kg/mL. Вредност ударног волумена срца је израчунавана дељењем вредности минутног волумена срца са вредношћу срчане фреквенце, а изражена је у јединици mL/kg.



**Слика 3.2.** Уређај 9800TCR *Cardiomax III-TCR* коришћен за хемодинамска мерења (доступно на: <http://www.colinst.com/products/cardiac-output-computer-cardiomax-iii> датум приступа 28.3.2018.)

За потребе мерења протока крви кроз аорту, каротидну и реналну артерију, крвни судови су пажљиво препаровани. Ултразвучна сонда, повезана са регистратором протока (*Transonic System Inc.*, Итака, Њујорк, САД) (Слика 3.3.), унутрашњег пречника 1 mm, је постављана око каротидне и реналне артерије, док је за аорту коришћена већа сонда унутрашњег пречника 2 mm. Протоци крви кроз поменута корита су изражени у mL/min/kg т.м. Отпори протоку крви кроз ове крвне судове израчунати су дељењем вредности средњих артеријских притисака (регистрованих током мерења протока) са одговарајућим протоцима. Вредности отпора изражаване су у mmHg min kg/mL.



Слика 3.3. Приказ записа хемодинамских параметара мерених уређајем 9800TCR *Cardiomax III-TCR* (доступно на: <http://www.colinst.com/products/cardiac-output-computer-cardiomax-iii> датум приступа 28.3.2018.)

### 3.9.4. Узорковање крви, урина и бубрега

Након хемодинамских мерења, узимани су узорци крви из рачве абдоминалне аорте који су касније коришћени за биохемијске анализе. Као антикоагулант коришћен је литијум хепарин (*Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД) концентрације 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$  крви. Након узорковања, крв је центрифугирана 20 min на 4000 обртаја у



Слика 3.4. Регистратор протока крви кроз каротидну, реналну артерију и аорту

минути (*Ultra centrifuga Heraeus Megafuge 1.0 R*), како би се раздвојили плазма и еритроцити. Плазма је замрзнута и даље чувана на  $-20^{\circ}\text{C}$ , док су еритроцити у још четири циклуса испирани у хладном физиолошком раствору и центрифугирани на 2000 обртаја у минути у трајању од 10 min. Након тога, еритроцити су замрзавани и чувани на  $-80^{\circ}\text{C}$ , до даљих анализа.

Узорци двадесетчетворочасовног урина су сакупљани у индивидуалним метаболичким кавезима (Tecniplast USA - Laboratory Animal Equipment), након чега су центрифугирани на 4000 обртаја у минути у трајању од 20 min. Супернатант је након центрифугирања чуван на  $-20^{\circ}\text{C}$  до даљих анализа.

Бубрези су декапсулирани, након чега је мерена њихова маса на аналитичкој ваги (*Mettler AE200*). Непосредно након мерења масе, леви бубрег је сечен на три приближно једнака дела и чуван на  $-80^{\circ}\text{C}$  до даље анализе.



**Слика 3.5.** Метаболички кавез коришћен за колекцију 24-часовног урина

### 3.9.5. Одређивање биохемијских параметара

#### 3.9.5.1. Концентрација метаболита азотног монооксида

Концентрација укупних метаболита NO - нитрата и нитрита ( $NO_x$ ), као и концентрација нитрита ( $NO_2^-$ ) у плазми и урину, сматрају се мерилом активности NOS ензима и продукције NO. Одређивање  $NO_x$  је посредно, превођењем  $NO_3^-$  у  $NO_2^-$  који се затим, заједно са већ присутним нитритима у узорку, одређују методом заснованом на Грисовој реакцији (Green et al. 1982). Укратко, разблажени узорци плазме и урина су депротеинизовани додавањем  $5 \mu\text{L}$   $15 \text{ g/L}$   $ZnSO_4$  (Кемика, Загреб, Југославија). Након тога је на микроплочу наношено  $50 \mu\text{L}$  узорка уз додатак ензима нитрат редуктазе (*Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД), коензимима флавин аденин динуклеотида (*Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД) и *NADPH* (*Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД). уследила је инкубација у трајању од 60 min, и додавање  $100 \mu\text{L}$  Грисовог реагенса. Грисов реагенс се припрема мешањем у размери 1 : 1 (*v/v*)  $120 \text{ mM}$  сулфаниламида (*Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД) и  $8 \text{ mM}$  N-(1-нафтил)-етилендиамина (*Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД) растворених у 2,5% *o*-фосфорној киселини (*Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД). Након 20 min инкубације на собној температури, мерена је апсорбанца на 540 nm на *ELISA* читачу *Multiscan Plus Elisa reader* (*Labsystems*, Ванта, Финска). Резултати су изражени у mmol/L.

Концентрација  $NO_2^-$  је одређивана такође Грисовом реакцијом (Green et al. 1982). Узорци плазме и урина су депротеинизовани додавањем  $5 \mu\text{L}$   $15 \text{ g/L}$  цинк сулфата након чега је на микроплочу наношено  $100 \mu\text{L}$  узорка плазме или урина и  $100 \mu\text{L}$  Грисовог реагенса. Након инкубације у трајању од 20 min у мраку на собној температури, вршено је читање на 540 nm. Резултати су изражени у mmol/L. Иста метода је коришћена и за одређивање садржаја нитрита у екстракту, а резултат је изражен у mg/g UE.

### 3.9.5.2. Одређивање степена липидне пероксидације

TBARS (енгл. *thiobarbituric acid reactive substances assay*) метода је коришћена за процену степена липидне пероксидације у плазми, еритроцитима и урину SHR (Ohkawa et al. 1979). У адекватно припремљене узорке додавана је трихлорсирћетна киселина (*Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД) након чега је узорак инкубиран 10 min на леду и центрифугиран на 15000 обртаја у минути током 5 min. Након центрифугирања, у супернатант је додата тиобарбитурна киселина (*Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД) и све је инкубирано на 100°C током 15 min. Узорци су наносени на микроплочу након чега је мерена апсорбанца на 540 nm. Резултати су изражени у nmol/mL плазме и урина и nmol/g Hb еритроцита. Концентрација TBARS-a је израчунавана по следећој формули:

$$C = (A-B) \times 0,012 \times R \times 1000$$

A – апсорбанца узорка,

B – апсорбанца следеће пробе,

R – разблажење.

### 3.9.5.3. Одређивање активности ензима антиоксидативне заштите у еритроцитима

Еритроцити су лизирани хладном дејонизованом водом (еритроцити:вода=1:6). За потребе одређивања активности ензима антиоксидативне заштите, најпре је у овим лизатима одређиван садржај хемоглобина. Затим, у зависности од анализе, лизат је разблаживан и у њему су појединачно одређиване активности ензима антиоксидативне заштите SOD, CAT, GSH-Px и GR. Мерења апсорбанце су вршена на спектрофотометру *Ultraspec 3000 pro UV/Visible* (*Amersham Biosciences Corp.*, Њујорк, Њујорк, САД).



### 3.9.5.3.1. Одређивање садржаја хемоглобина у еритроцитима

У 5 mL Драпкиновог реагенса (Мол, Београд, Србија) додато је 20  $\mu$ L лизата еритроцита (Drabkin & Austin 1935). Након инкубације 15 min у мраку на собној температури, мерена је апсорбанца на 545 nm. Садржај хемоглобина је израчунаван на основу следеће формуле:

$$C_{Hb} [\text{g}/100 \text{ mL}] = A_{545} \times 36,77$$

Где је  $A_{545}$  апсорбанца узорка на таласној дужини од 545 nm.

### 3.9.5.3.2. Одређивање активности супероксид дисмутазе

Активност SOD је одређивана методом заснованом на смањењу брзине редукције цитохрома c (Misra, Nara & Fridovich 1972). Наиме, уз непрестано мешање у узорак су додати 1 mL етанола (Етил-алкохол, Зорка, Шабац, Србија) и 0,6 mL хлороформа (Sigma-Aldrich, Сент Луис, Мисури, САД). Узорци су након тога центрифугирани на 3000 обртаја у минути у току 15 min. Након центрифугирања, одвојен је супернатант у коме је одређивана активност ензима.

За одређивање активности SOD у еритроцитима су коришћени  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{EDTA}$  (енгл. ethylenediaminetetraacetic acid, ICN Biochemicals, Кливленд, Охајо, САД) пуфер и адреналин (Sigma-Aldrich, Сент Луис, Мисури, САД) који је растваран у 0,1 M HCl (Zorka Pharma, Шабац, Србија). У стаклену кивету је сипан пуфер, узорак у запремини потребној да дође до редукције линеарног дела криве аутооксидације адреналина за 30-40%, и адреналин у запремини потребној да промена апсорбанце мерене на 480 nm буде у распону од 0,020-0,022  $\text{min}^{-1}$ . Активност SOD је изражавана у јединици активности овог ензима по граму хемоглобина (U/g Hb). Формула по којој је израчунавана активност SOD је:

$$SOD (U/g Hb) = (\Delta A - \Delta K)V / (\epsilon l C_{Hb} V_u)$$

$\Delta K$  - промена апсорбанце контроле,

$\Delta A$  - промена апсорбанце узорка,

$C_{Hb}$  - концентрација хемоглобина,

$V_u$  - запремина узорка,

$V$  - укупна запремина,

$\varepsilon$  - екстинкциони коефицијент,

$l$  - дужина оптичког пута.

#### 3.9.5.3.3. Одређивање активности каталазе

За одређивање активности *CAT* коришћена је метода заснована на спектрофотометријском праћењу брзине редукције водоник пероксида у присуству *CAT* на таласној дужини од 230 nm на којој водоник пероксид има апсорпциони пик (Beutler 1982). Коришћен је *TRIS/EDTA* пуфер (енгл. *tris(hydroxymethyl)aminomethane*, *Serva*, Хајделберг, Немачка). Раствор водоник пероксида прављен је разблаживањем 30%-тног раствора водоник пероксида (Центрохем, Стара Пазова, Србија) тако да вредност апсорбанце на 230 nm буде око 0,8. Само мерење апсорбанце је вршено у кварцним киветама у које је сипано 50  $\mu\text{L}$  пуфера, узорка у запремини потребној да промена апсорбанце буде 0,03-0,06  $\text{min}^{-1}$  и 1 mL *rastvora*  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Промена апсорбанце је праћена на сваких 30 s у току 3 min. На крају, активност *CAT* је израчуната на основу формуле:

$$CAT (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/g Hb}) = (\Delta A - \Delta K)V/(\varepsilon l C_{Hb} V_u)$$

$\Delta K$  - промена апсорбанце контроле,

$\Delta A$  - промена апсорбанце узорка,

$C_{Hb}$  - концентрација хемоглобина,

$V_u$  - запремина узорка,

$V$  - укупна запремина,

$\varepsilon$  - екстинкциони коефицијент,

$l$  - дужина оптичког пута.

3.9.5.3.4. Одређивање активности глутатион пероксидазе

Активност *GSH-Px* је одређивана на основу методе која се заснива на следећој реакцији:



*GSH* – глутатион,

*GSSG* – оксидовани глутатион,

*NADP*<sup>+</sup> - оксидована форма *NADPH*.

Овом методом је одређивана *GSH-Px* активност посредно, преко оксидације *NADPH* у присуству *GR* праћењем промене апсорбанце на 340 nm (Andersen et al. 1997).

У кварцну кивету је додато 1,6 mL воде, 0,3 mL 1mM раствора *GSH* (*Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД), 0,6 ml 0,2 mM раствора *NADPH* (*Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД), 0,3 mL 0,5 M фосфатног пуфера, 0,1 mL 0,03 M *t*-бутилхидропероксида (*Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД), 50 μL Драпкиновог реагенса (Мол, Београд, Србија), 5μL *GR* (*Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД), и узорак. Праћена је промена апсорбанце током 150 s на таласној дужини од 340 nm. Активност *GSH-Px* је израчунавана на следећи начин:

$$\text{GSH-Px } (\mu\text{mol NADPH}/\text{min}/\text{g Hb}) = (\Delta A - \Delta K)V / (\epsilon l C_{\text{Hb}} V_u)$$

$\Delta K$  - промена апсорбанце контроле,

$\Delta A$  - промена апсорбанце узорка,

$C_{\text{Hb}}$  - концентрација хемоглобина,

$V_u$  - запремина узорка,

$V$  - укупна запремина,

$\epsilon$  - екстинкциони коефицијент,

$l$  - дужина оптичког пута.

### 3.9.5.3.5. Одређивање активности глутатион редуктазе

Метода коришћена при одређивању активности  $GR$  се заснивала на праћењу оксидације  $NADPH$  на 340 nm до које долази у реакцији редукције  $GSSG$  (Andersen et al. 1997):



$GSH$  – глутатион,

$GSSG$  – оксидовани глутатион,

$NADPH$  – никотинамид аденин динуклеотид,

$NADP^+$  - оксидована форма  $NADPH$ .

У кварцну кивету је додато 0,6 mL 0,5 M фосфатног пуфера, 0,1 mL 2 mM  $GSSG$  (*Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД), 0,1 mL 50 mM  $EDTA$  (*ICN Biochemicals*, Кливленд, Охајо, САД), 0,1 mL 2 mM  $NADPH$  (*Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД), 0,1 mL узорка и 3 mL воде. Промена апсорбанце је праћена током 3 min, а активност је израчунавана на основу формуле:

$$GR(\mu\text{mol } NADPH/\text{min/g } Hb) = (\Delta A - \Delta K)V/(\epsilon l C_{Hb} V_u)$$

$\Delta K$  - промена апсорбанце контроле,

$\Delta A$  - промена апсорбанце узорка,

$C_{Hb}$  - концентрација хемоглобина,

$V_u$  - запремина узорка,

$V$  - укупна запремина,

$\epsilon$  - екстинкциони коефицијент,

$l$  - димензија кивете.

#### 3.9.5.4. Одређивање концентрације ензима антиоксидативне заштите у еритроцитима

Квантитативно одређивање ензима *SOD*, *CAT* и *GSH-Px* вршено је коришћењем комерцијалних имуноензимских *ELISA* (енгл. *enzyme-linked immunosorbent assay*, *Cusabio Biotech Co., Ltd*, Вухан, Хубеи, Кина) тестова заснованих на сендвич имуноесеј техници. При извођењу ових тестова у потпуности су праћена детаљна упутства и препоруке произвођача.

#### 3.9.5.5. *Western blot* анализа

Ткиво бубрега је хомогенизовано у хладном *RIPA* (енгл. *radioimmunoprecipitation buffer*) пуферу за лизу ћелија припремљеном од 50 mM *Tris-HCl* pH 7,5 (*Serva*, Хајделберг, Немачка), 150 mM *NaCl* (*Applichem*, Дармштат, Немачка), 0,5% *Triton*<sup>TM</sup> X-100 (*Serva*, Хајделберг, Немачка), 1% *Na-deoksiholat*, 0,1% *SDS* (енгл. *sodium dodecyl sulfate*), 2 mM *EDTA* (*ICN Biochemicals*, Кливленд, Охајо, САД) и 50 mM *NaF*, док је масени однос ткива и пуфера износио 1:10. У пуфер су додавани инхибитори протеаза: 200 mM *Na-ортанвандат* (*Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД), коктел инхибитора протеаза (*Pierce, Thermo Fisher Scientific*, Валтхам, Масачусетс, САД), 100 mM *PMSF* (енгл. *phenylmethylsulfonyl fluoride*) и 1 M *E-ACA* (енгл. *e-aminocaproic acid*). Овако припремљени узорци су инкубирани 25 min на леду, па затим центрифугирани на 15000 g, на 4°C у току 20 min. Концентрација протеина у супернатанима одређивана је помоћу комерцијалног *BSA* теста (енгл. *Bovine serum albumin, BSA Protein Assay Kit, Pierce, Thermo Fisher Scientific*, Валтхам, Масачусетс, САД). Узорци су даље чувани на -80°C, до даљих анализа.

Узорци са једнаком количином протеина су мешани са пуфером за припрему узорака који је садржао 0,125 M *Tris-HCl*, 4%-тни *SDS*, 20%-тни глицерол (*Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД), 10%-тни β-меркаптоетанол (*Applichem*, Дармштат, Немачка), 0,02%-тни бромфенол плаво pH 6,8 (*Sigma-Aldrich*, Сент Луис,

Мисури, САД), након чега су кувани 5 min у води. Овако припремљени узорци су наношени на гел који је садржао 4 или 10% акриламида, а затим су протеини из узорака раздвајани SDS-PAGE електрофорезом (енгл. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) током 1,5 h при константној струји јачине 130 mA. Преношење протеина на нитроцелулозну мембрану величине поре од 0.45  $\mu\text{m}$  (*Applichem, GmbH*, Дармштадт, Немачка) је вршено полусувим електротрансфером који је трајао 1,5 h при струји јачине 100 mA.

Неспецифично везивање протеина за мембрану је блокирано третирањем мембране раствором 5%-тног BSA у TBS пуферу (енгл. *tris-buffered saline*) у току 1 h на собној температури. Мембрана је затим инкубирана са примарним антителима (разблажење 1:1000) *nNOS* (*Chemicon International Inc.* Темекула, Калифорнија САД), *iNOS* (*Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД), *eNOS* (*Invitrogen by Thermo Fisher Scientific*, Валтхам, Масачусетс, САД), и актин (*Sigma Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД). Након испирања са TBS-Tween раствором (TBS у који је додаван Tween-20, *Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД) мембрана је инкубирана током 2 h са секундарним антителом коњугованим са пероксидазом у разблажењу 1:40000 (*Peroxidase-conjugated goat antirabbit immunoglobulin*, *Sigma Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД). Мембрана је поново испирана са раствором TBS-Tween, а потом и само са TBS.

Протеини обележени антителима су детектовани уз помоћ реагенса за хемилуминесценцију, који садржи луминол, супстрат ензима пероксидазе (*GE Healthcare*, Амерсхам, УК). Протеинске траке визуелизоване су на ауторадиографском филму (*Santa Cruz Biotechnology*, Далас, Тексас, САД), а њихов интензитет анализиран је на основу протеинског маркера (*Page Ruler plus Prestained Protein Ladder*, *Pierce, Thermo Fisher Scientific*, Валтхам, Масачусетс, САД) и денситометрјски, применом програма *Image Master Total Lab v1.11 software* (*Amersham, Pharmacia Biotech*, Упсала, Шведска).

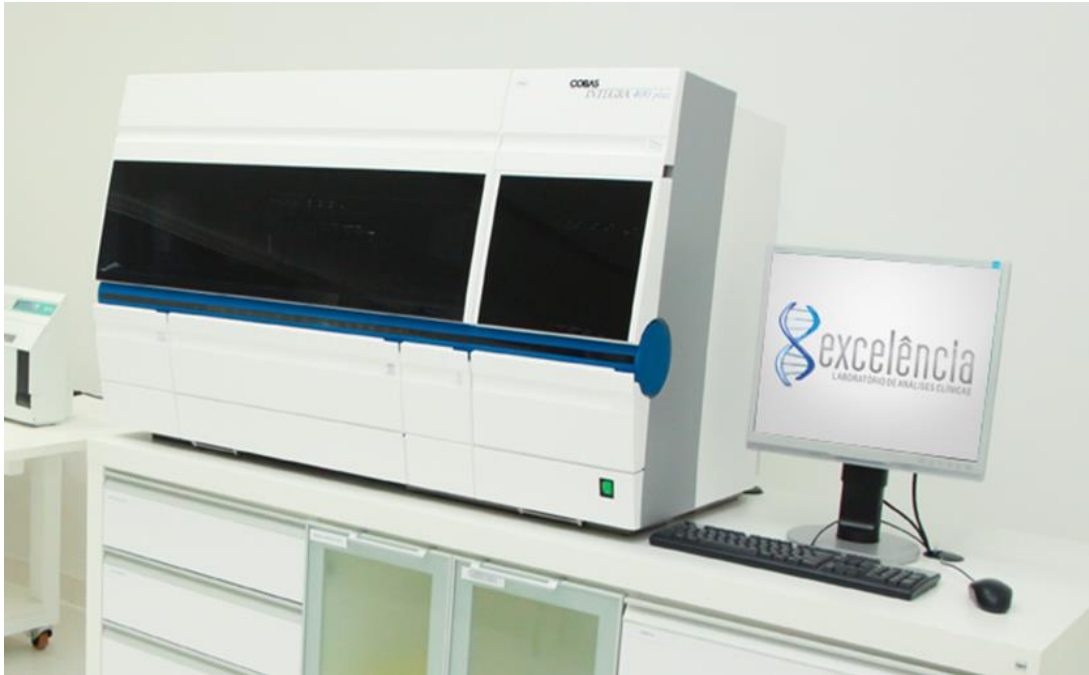
### 3.9.5.6. Одређивање осталих биохемијских параметара

Сви наведени биохемијски параметри су одређивани на уређају *COBAS INTEGRA 400 plus* (*Hoffmann-La Roche*, Немачка) (Слика 3.6.).

- Концентрација креатинина - спектрофотометријском методом за плазму и урин коришћењем комерцијалних китова (*CREJC* и *CREJU* тест касете за плазму и урин, *Roche Diagnostics*, Немачка).
- Концентрација урее - спектрофотометријском методом за плазму и урин коришћењем комерцијалног кита (*UREL* и *URELU* тест касете за плазму и урин, *Roche Diagnostics*, Немачка).
- Концентрација протеина - колориметријским методама за плазму и урин коришћењем комерцијалних китова (*TP2* и *TPUC2* тест касете за плазму и урин, *Roche Diagnostics*, Немачка).
- Укупни холестерол у плазми - колориметријском методом коришћењем комерцијалног кита (*CHOL2* тест касета, *Roche Diagnostics*, Немачка).
- Концентрација *HDL* холестерола у плазми - колориметријском методом коришћењем комерцијалног кита (*HDL\_3* тест касета, *Roche Diagnostics*, Немачка).
- Концентрација триглицерида у плазми - колориметријском методом коришћењем комерцијалног кита (*TRIGL* тест касета, *Roche Diagnostics*, Немачка).
- Концентрација *LDL* холестерола у плазми - ензимском колориметријском методом коришћењем комерцијалног кита (*LDL\_C* тест касета, *Roche Diagnostics*, Немачка).
- Одређивање концентрације мокраћне киселине - ензимском колориметријском методом за плазму и урин коришћењем комерцијалног кита (*UA2* тест касета, *Roche Diagnostics*, Немачка).

- Концентрација албумина у урину - турбидиметријском методом коришћењем комерцијалног кита (*ALBU* тест касета, *Roche Diagnostics*, Немачка).
- Концентрација глукозе у плазми - ензимском методом коришћењем комерцијалног кита (*GLUC2* тест касета, *Roche Diagnostics*, Немачка).
- Активност *ALT* у плазми - колориметријском методом коришћењем комерцијалног кита (*ALT* тест касета, *Roche Diagnostics*, Немачка).
- Активност *AST* у плазми - колориметријском методом коришћењем комерцијалног кита (*AST* тест касета, *Roche Diagnostics*, Немачка).
- Активност глутамат дехидрогеназе у плазми - *UV* тестом по стандардизованој методом коришћењем комерцијалног кита (*GLDH3* тест касета, *Roche Diagnostics*, Немачка).
- Активност *LDH* у плазми - колориметријском методом коришћењем комерцијалног кита (*LDHL* тест касета, *Roche Diagnostics*, Немачка).
- Активност липазе у плазми - ензимском колориметријском методом коришћењем комерцијалног кита (*LIPC* тест касета, *Roche Diagnostics*, Немачка).
- Концентрација укупног билирубина у плазми - колориметријском методом коришћењем комерцијалног кита (*BIL-T* тест касета, *Roche Diagnostics*, Немачка)
- Капацитет везивања незасићеног гвожђа, *UIBC* (енгл. *Unsaturated Iron Binding Capacity*) - колориметријском методом коришћењем комерцијалног кита (*UIBC* тест касета, *Roche Diagnostics*, Немачка).
- Концентрација гвожђа у плазми - колориметријском методом коришћењем комерцијалног кита (*IRON* тест касета, *Roche Diagnostics*, Немачка).





Слика 3.6. Биохемијски анализатор COBAS INTEGRA 400 plus (доступно на: <http://www.excelencialaboratorio.com.br/tecnologia.php> датум приступа 28.3.2018.)

Процена бубрежне функције је вршена на основу брзине гломерулске филтрације одређиване помоћу клиренса ендогеног креатинина и клиренса урее који су израчунавани на основу следећих формула:

$$C_{cr} = U_v \times U_{cr} / P_{cr} \qquad C_u = U_v \times U_u / P_u$$

$C_{cr}$  – клиренс креатинина (mL/min/kg)

$U_{cr}$  – концентрација креатинина у урину (mmol/L)

$P_{cr}$  – концентрација креатинина у плазми ( $\mu$ mol/l)

$C_u$  – клиренс урее (ml/min/kg)

$U_u$  – концентрација урее у урину (mmol/l)

$P_u$  – концентрација урее у плазми (mmol/l)

$U_v$  – запремина излученог урина у току 24h (ml/min).

### 3.9.6. Статистичка обрада података

Статистичка обрада података, као и предвиђање и потврда добијеног математичког модела је вршена коришћењем софтвера *Statistica 7.0* (*StatSoft Inc.*, Тулса, Оклахома, САД). Приказани резултати представљају средње вредности и стандардне грешке. Разлике између група података су утврђене коришћењем једнофакторске *one-way ANOVA* (енгл. *analysis of variance*) статистичке технике и *Fisher LSD* (енгл. *LSD - least significant difference*) *post hoc* теста. Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка, а *p* вредност нижа или једнака 0,05 је сматрана значајном.

---

## 4. Резултати

### 4.1. Оптимизација екстракције фенолних једињења из листа

#### *Urtica dioica* L.

У првој фази оптимизације екстракције фенолних једињења из листа коприве вршено је упоређивање екстракционих могућности етанола, метанола и воде. Ово поређење је вршено на основу вредности садржаја *TP*, антиоксидативног капацитета, као и садржаја појединачних фенолних једињења у 50, 75 и 100%-тном метанолном, 50, 75 и 96%-тном етанолном и у воденом екстракту. Сви екстракти добијени су мацерацијом у трајању од 30 min.

Резултати прве фазе испитивања су коришћени за другу фазу у којој је вршена оптимизација трајања екстракције и процента алкохола у екстракционом средству са циљем добијања највећег *TP* приноса.

У последњој фази оптимизације испитиван је утицај ултразвука на садржај *TP* и укупних флавоноида, садржај појединачних фенолних једињења и антиоксидативни капацитети екстраката.

Екстракту припремљеном под оптималним екстракционим условима (трајање екстракције, екстракционо средство и метода) који су добијени на основу претходних фаза оптимизације, одређиван је антиоксидативни капацитет и способност неутралисања супероксидног радикала. Поред тога, истом екстракту је одређена способност хелирања јона гвожђа и садржај нитрита, а добијени резултати су детаљно изложени у поглављима која следе.

#### 4.1.1. Садржај укупних фенола

Резултати садржаја *TP* у свим поменутих екстрактима су приказани у табели 4.1. При поређењу вредности садржаја *TP* у екстрактима са истим процентом алкохола (метанола и етанола), екстракциона средства вода-метанол су показала боља екстракциона својства од екстракционих средстава вода-етанол. Наиме, водено-метанолни екстракти су имали значајно веће садржаје *TP* од одговарајућих водено-етанолних екстраката (50% *MeOH* у поређењу са 50% *EtOH*,  $p < 0,01$ ; 75% *MeOH* у поређењу са 75% *EtOH*,  $p < 0,01$ ; 100% *MeOH* у поређењу са 96% *EtOH*,  $p < 0,05$ ). Поред тога, чиста вода се показала као лошије екстракционо средство од 50%-тног метанола са којим је остварен највиши *TP* принос ( $p < 0,001$ ).

#### 4.1.2. Резултати *HPLC-DAD* и *LC/MS* анализе

*HPLC-DAD* и *LC/MS* методама је извршено раздвајање, идентификација и квантификовање појединачних фенолних једињења присутних у екстрактима.

Тако је *LC/MS* методом у 50%-тном метанолном екстракту детектовано присуство две класе фенолних једињења: хидроксициметна киселина и њени деривати (2-О-кафеоил мална, хлорогенска, *p*-кумароил малат и кафена киселина) као и флавоноиди (рутин, изокверцетин, кемферол-3-О-рутинозид, изорамнетин-3-О-рутинозид и изораметин хексозид) (Слика 4.1.). Од тога су најзаступљенији били хлорогенска киселина, 2-О-кафеоил мална киселина и рутин.

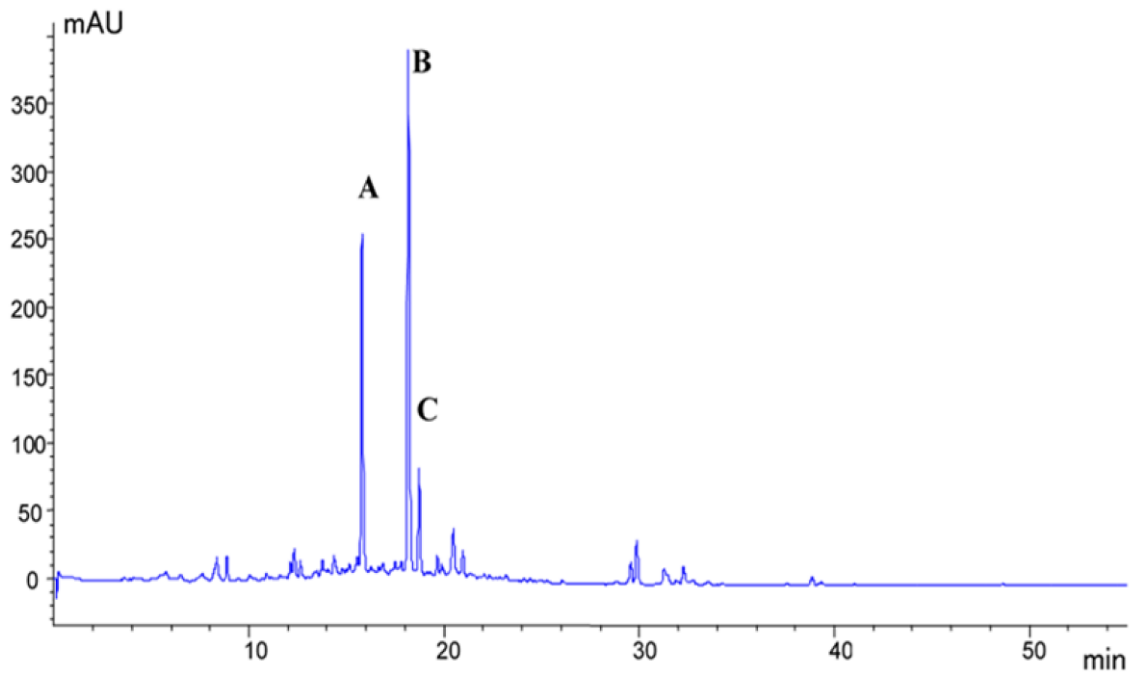
Коришћењем *HPLC-DAD* анализе је у 50, 75 и 100%-ном метанолном, 50, 75 и 96%-ном етанолном и воденом екстракту листа коприве извршено раздвајање и квантификација најприсутнијих фенолних једињења: хлорогенске киселине, 2-О-кафеоил малне киселине и рутина (Табела 4.1.). Екстракциона средства су при анализи приноса појединачних фенолних једињења показала слична екстракциона својства као и у случају *TP* садржаја. Наиме, водено-метанолни екстракти су имали

**Табела 4.1.** Садржај укупних фенола (*TP*), хлорогенске, 2-*O*-кафеоил малне киселине и рутина, као и антиоксидативни капацитети (*DPPH*) 50, 75 и 100%-тног метанолног (*MeOH*), 50, 75 и 96%-тног етанолног (*EtOH*) и воденог екстракта листа коприве припремљених мацерацијама у трајању од 30 min

Узорак	TP, mg GAE/g с.м.	Хлорогенска киселина, µg/mL	2- <i>O</i> -кафеоил мална киселина, µg CAE/mL	Рутин, µg/mL	<i>DPPH</i> , <i>EC</i> <sub>50</sub> mg/mL
50% <i>MeOH</i>	9,1±0,9**	89,0±4,9***	82,2±5,2***	57,1±3,8***	0,338±0,021
75% <i>MeOH</i>	6,9±0,9##	79,4±4,3###	61,0±5,2###	40,0±4,3###	0,640±0,046
100% <i>MeOH</i>	1,6±0,3 <sup>s</sup>	2,9±0,1	5,3±0,4	6,4±0,1 <sup>\$s</sup>	1,550±0,329 <sup>\$\$s</sup>
50% <i>EtOH</i>	7,4±0,5	62,3±3,1	52,1±3,1	42,2±2,8	0,527±0,027
75% <i>EtOH</i>	5,1±0,1	43,8±3,3	24,4±2,1	22,2±1,9	0,699±0,028
96% <i>EtOH</i>	0,4±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,5±0,0	14,435±1,000
H <sub>2</sub> O	7,3±1,1&&&	3,9±0,0&&&	51,4±5,6&&&	9,8±0,1&&&	0,640±0,014

(\*<sup>o</sup>  $p < 0,01$  и \*\*\*<sup>o</sup>  $p < 0,001$  у поређењу са 50% *EtOH*; ##<sup>o</sup>  $p < 0,01$  и ###<sup>o</sup>  $p < 0,001$  у поређењу са 75% *EtOH*; <sup>s</sup>  $p < 0,05$  и <sup>\$\$</sup>  $p < 0,01$  у поређењу са 96% *EtOH*; &&&<sup>o</sup>  $p < 0,001$  у поређењу са 50% *MeOH*)

µg CAE/mL – изражено на садржај кафеине киселине (CAE, енгл. caffeic acid equivalents)



Слика 4.1. HPLC хроматограм 50%-тног ментанолног екстракта листа коприве (трајање екстракције 30 min,  $\lambda=280$  nm) (A) хлорогенска киселина, (B) 2-О-кафеоил мална киселина и (C) рутин

имали значајно виши садржај хлорогенске и 2-О-кафеоил малне киселине као и рутина. Тако су 50 и 75%-тни метанолни екстракти показали значајно више садржаје хлорогенске киселине, 2-О-кафеоил малне киселине и рутина у односу на 50 и 75%-тни етанолни екстракт ( $p < 0,001$ ). У случају рутина, 100%-тни метанолни екстракт је показао боље екстракционе карактеристике у поређењу са 96%-тним етанолним екстрактом ( $p < 0,01$ ). Вода није показала добре екстракционе карактеристике по питању садржаја хлорогенске киселине, 2-О-кафеоил малне киселине и рутина јер је водени екстракт имао значајно ниже садржаје ових једињења у поређењу са 50% MeOH екстрактом ( $p < 0,001$ ).

#### 4.1.3. Антиоксидативни капацитет екстракта

Антиоксидативни капацитети мерен *DPPH* методом је био значајно виши само код 100%-тног метанолног екстракта у поређењу са 96%-тним етанолним екстрактом ( $p < 0,001$ ) (Табела 4.1.).

#### 4.1.4. *RSM* модел

С обзиром да су водено-метанолни екстракти при поређењу са водено-етанолним и воденим екстрактом имали више садржаје *TP*, као и садржаје појединачних фенолних једињења, екстракционо средство вода-метанол је одабрано за даљу оптимизацију.

Математички модел који је коришћен за моделовање зависности садржаја *TP* од процента метанола у раставарачу и трајања екстракције је била полиномијална једначина другог реда. Регресиони коефицијенти овог вишеструког регресионог модела су одређени методом најмањих квадрата и приказани су у табели 4.2. заједно са тестом њихове значајности.

Полиномијална једначина другог реда која описује зависност *TP* од процента метанола у раставарачу и трајања екстракције је:

$$TP \text{ (mg GAE/g с.м.)} = 7,42 - 3,44X_1 - 2,17X_1^2 - 0,18X_2 - 0,30X_2^2 + 0,30X_1X_2$$

$X_1$  – кодирана вредност фактора: проценат метанола,

$X_2$  – кодирана вредност фактора: трајање екстракције.

Вредност  $R^2$  за ову једначину је била висока и износила је 0,993. У табели 4.2. приказане су вредности измерених и предвиђених *TP* садржаја у екстрактима добијеним при различитим комбинацијама вредности независних фактора (процент метанола и трајање екстракције).

**Табела 4.2.** Кодиране вредности фактора: проценат метанола у екстракционом средству ( $X_1$ ) и трајање екстракције ( $X_2$ ), експериментално измерени и предвиђени садржај укупних фенола ( $TP$ )

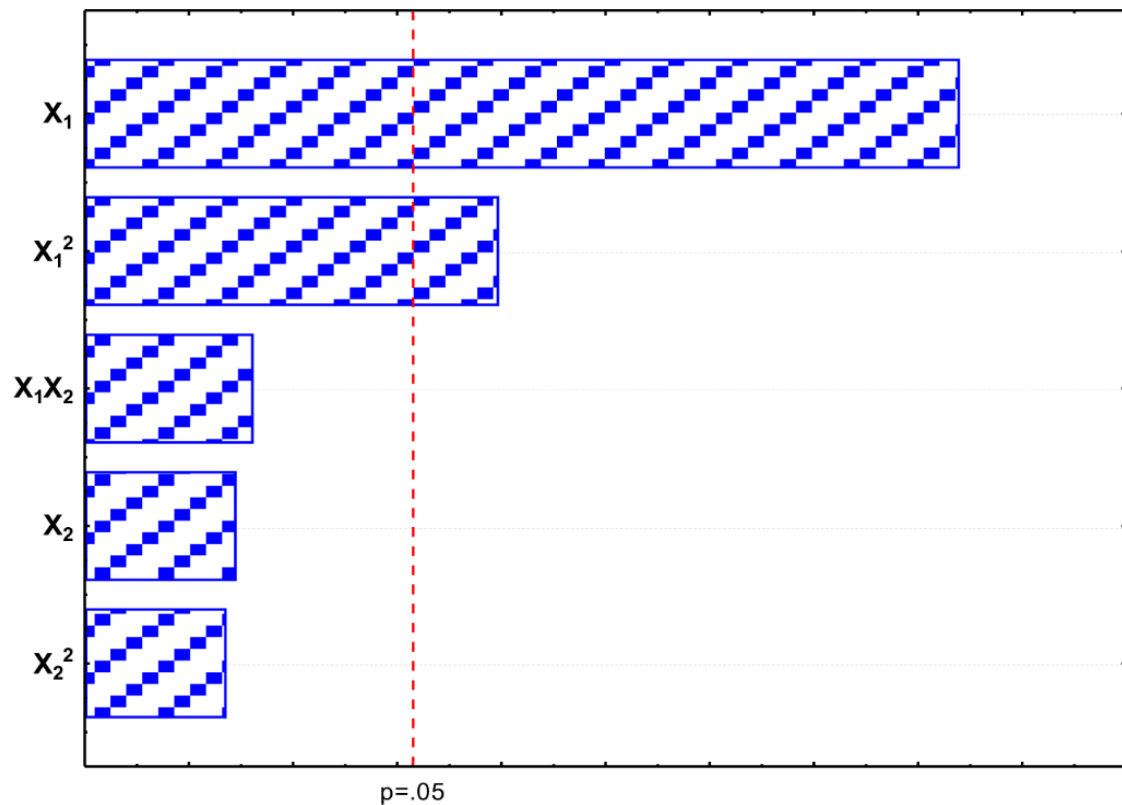
Редослед	Фактори		$TP$ , mg GAE/g с.м.	$TP$ , mg GAE/g с.м.
	$X_1$	$X_2$	(измерена вредност)	(предвиђена вредност)
1	-1	1	7,8±1,5	8,2
2	1	1	1,4±0,2	1,3
3	-1	0	8,6±1,0	8,6
4	0	1	7,2±0,9	7,0
5	0	-1	6,9±0,9	7,3
6	0	0	7,6±1,1	7,3
7	1	-1	1,6±0,2	1,6
8	-1	-1	9,1±0,9	8,6
9	1	0	1,5±0,1	1,6

Утицај појединачних фактора на принос  $TP$  је процењен на основу значајности регресионих коефицијената (Табела 4.3., Слика 4.2.). Од испитиваних фактора, трајање екстракције није показало значајан утицај на  $TP$  принос јер ни линеарни ни квадратни ефекат овог фактора није био значајан. С друге стране, проценат метанола у екстракционом средству је показао значајан утицај на  $TP$  принос у екстрактима јер су и линеарни ( $p < 0,01$ ) и квадратни ефекат овог фактора ( $p < 0,05$ ) били значајни. Регресиони коефицијенти за овај фактор су и за линеарни и за квадратни ефекат били негативне вредности, што указује на то да са повећањем процента метанола у екстракционом средству долази до смањења  $TP$  приноса.



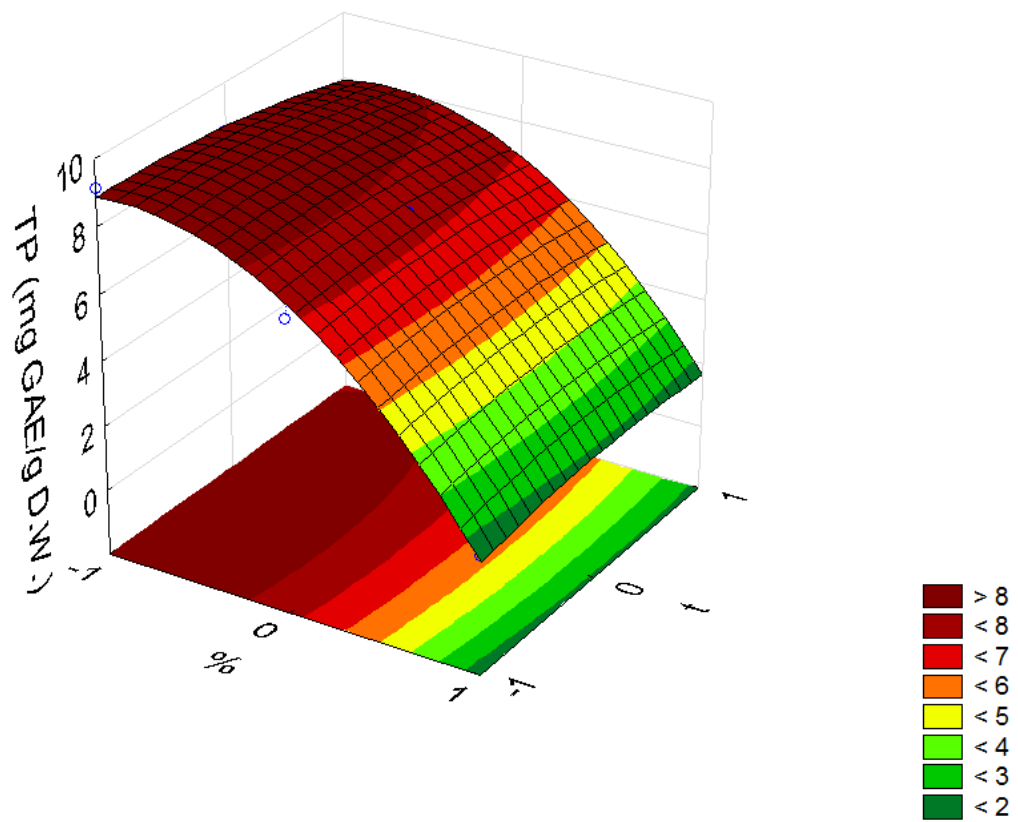
**Табела 4.3.** Регресиони коефицијенти и тест значајности за полиномијалну једначину другог реда коришћену за моделовање зависности садржаја укупних фанола ( $TP$ ) од процента метанола у екстракционом средству ( $X_1$ ) и трајања екстракције ( $X_2$ )

Фактори	Регресиони коефицијенти	Стандардна грешка	$p$
Средња вредност	7,41972	0,396058	0,002837
$X_1$	-3,43678	0,232209	0,004534
$X_1^2$	-2,16638	0,363802	0,027061
$X_2$	-0,18145	0,198029	0,456257
$X_2^2$	-0,30402	0,420082	0,544442
$X_1X_2$	0,30116	0,242535	0,340205



Слика 4.2. Парето дијаграм утицаја процента метанола ( $X_1$ ) и трајања екстракције ( $X_2$ ) на принос укупних фенола ( $TP$ )

На Слици 4.3. је приказан *RSP* (*RSP*, енгл. *response surface plot*) који графички приказује утицај процента метанола у екстракционом средству и трајања екстракције на  $TP$  садржај у екстракту листа коприве. Помоћу *RSM*-а одређени су услови за максималан  $TP$  принос и они су били 54%-тни метанол као екстракционо средство и трајање екстракције од 38 min.



Слика 4.3. Зависност садржаја укупних фенола ( $TP$ ) у екстракту листа коприве од процента метанола у екстракционом средству (%) и трајања екстракције ( $t$ )

#### 4.1.5. Утицај ултразвука на принос фенолних једињења и антиоксидативни капацитет екстраката

Како би се оценио утицај ултразвука на *TP* принос, садржај укупних флавоноида, као и принос појединачних фенолних једињења, као и на антиоксидативни капацитет екстраката листа коприве, вршено је упоређивање две екстракционе технике (*UAE* и мацерација). Поређење је вршено између екстраката који су припремани поменути екстракционим методама при чему су коришћени претходно одређено оптимално екстракционо средство (54%-тни метанол) и четири екстракциона времена (10, 20, 30 и 38 min), а резултати су приказани у Табелама 4.4. и 4.5.

Примена ултразвука је повећала принос *TP*, укупних флавоноида, хлорогенске и 2-*O*-кафеоил малне киселине у односу на садржаје ових једињења у екстрактима припремљеним мацерацијом (Табела 4.4.). Ултразвучна екстракција у трајању од 10 min је у поређењу са мацерацијом у трајању од 10 min побољшала садржај *TP*, укупних флавоноида, хлорогенске и 2-*O*-кафеоил малне киселине ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$  и  $p < 0,01$ , за *TP*, укупне флавоноиде, хлорогенску и 2-*O*-кафеоил малну киселину, редом). Слично, при екстракцији у трајању од 20 min, *UAE* екстракти су у поређењу са мацерацијом припремљеним екстрактима имали значајно више садржаје хлорогенске и 2-*O*-кафеоил малне киселине ( $p < 0,05$ ). Тенденција да ултразвук побољшава екстракцију се поновила и у случају две најдуже екстракције, па је тако *UAE* екстракција у трајању од 30 min у поређењу са мацерацијом у трајању од 30 min показала значајно виши садржај *TP*, хлорогенске и 2-*O*-кафеоил малне киселине ( $p < 0,001$ ), док се слично поновило и у случају *UAE* екстракције у трајању од 38 минута ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$  и  $p < 0,05$ , за *TP*, хлорогенску киселину и 2-*O*-кафеоил малну киселину, редом). Такође, *UAE* екстракти припремљени са 30 и 38-минутним трајањима екстракције су имали значајно више садржаје флавоноида

---

него одговарајући екстракти припремани мацерацијом ( $p < 0,01$ ). Поред тога, *UAE* екстракт добијен после 38 min екстракције је имао виши садржај *TP* од *UAE* екстраката припремљених са краћим трајањима екстракције (*UAE* 38 min у поређењу са *UAE* 10 min, *UAE* 20 min и *UAE* 30 min,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$  и  $p < 0,05$ ). Слично, исти екстракт је имао и значајно виши садржај укупних флавоноида него *UAE* екстракти припремљени са трајањима екстракције од 10 и 20 min (*UAE* 38 min у поређењу са *UAE* 10 min и *UAE* 20 min,  $p < 0,05$  и  $p < 0,01$ ). У случају рутина, сви екстракти припремљени применом *UAE* су имали значајно нижи садржај рутина у односу на екстракте припремљене мацерацијом са истим трајањем екстракције ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$  за 10 min, 20 min, 30 min и 38 min, редом).

Антиоксидативна активност је била виша у случају примене ултразвука (Табела 4.5.). Тако је код екстракта припремљеног ултразвучном екстракцијом у трајању од 10 min антиоксидативна активност мерена *DPPH*, *TEAC* и *FRAP* методом била значајно виша у поређењу са екстрактом припремљеним мацерацијом при истом трајању екстракције ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$  и  $p < 0,05$ , за *DPPH*, *TEAC* и *FRAP*, редом). Такође, екстракт припремљен *UAE* екстракцијом у трајању од 20 min је имао значајно бољи антиоксидативни капацитет у поређењу са одговарајућим екстрактом припремљеним мацерацијом ( $p < 0,05$  и  $p < 0,001$ , за *DPPH* и *TEAC* редом). Слично, при поређењу са екстрактом припремљеним мацерацијом са истим трајањем екстракције, *UAE* припремљен екстракт је показао значајно виши антиоксидативни капацитет при екстракцији у трајању од 30 min ( $p < 0,001$ , за *DPPH* и *TEAC*), као и при трајању екстракције од 38 min ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  и  $p < 0,05$ , за *DPPH*, *TEAC* и *FRAP*, редом). Поред тога, екстракт припремљен *UAE* екстракцијом од 38 min је имао значајно виши антиоксидативни капацитет у поређењу са *UAE* екстрактима припремљеним при трајањима екстракције од 10 и 20 min (*UAE* 38 min у поређењу са *UAE* 10 min и *UAE* 20 min,  $p < 0,001$ , за *TEAC*; *UAE* 38 min у поређењу са *UAE* 10 min и *UAE* 20 min,  $p < 0,05$  и  $p < 0,01$ , за *FRAP*).

**Табела 4.4.** Садржај укупних фенола (*TP*), укупних флавоноида, хлорогенске, 2-*O*-кафеоил малне киселине и рутина у 54%-тним метанолним екстрактима листа коприве припремљеним мацерацијом и ултразвучном екстракцијом (*UAE*) при различитим трајањима екстракције

Узорак	<i>TP</i> , mg <i>GAE</i> /g	Укупни флавоноиди, mg <i>CTE</i> /g	Хлорогенска киселина, µg/mL	2- <i>O</i> -кафеоил мална киселина, µg <i>CAE</i> /mL	Рутин, µg/mL
Мацерација, 10 min	8,4±0,0	4,8±0,0	79,5±4,2	75,8±5,1	53,6±3,8
Мацерација, 20 min	9,7±0,1	5,0±0,5	90,9±5,0	85,2±5,9	60,3±3,3
Мацерација, 30 min	9,1±0,9	5,1±0,0	89,0±4,9	82,2±5,2	57,1±3,8
Мацерација, 38 min	9,9±0,3	5,5±0,2	93,9±5,1	84,1±4,8	66,0±4,2
<i>UAE</i> , 10 min	9,8±0,3 <sup>**</sup> , <sup>+++</sup>	5,6±0,5 <sup>*,†</sup>	101,8±5,3 <sup>***</sup>	93,1±6,2 <sup>**</sup>	42,3±3,4 <sup>**</sup>
<i>UAE</i> , 20 min	10,0±0,2 <sup>+++</sup>	5,4±0,1 <sup>††</sup>	102,3±5,1 <sup>#</sup>	95,5±5,8 <sup>#</sup>	44,8±3,3 <sup>###</sup>
<i>UAE</i> , 30 min	11,7±0,8 <sup>\$\$\$</sup> , <sup>†</sup>	6,1±0,3 <sup>\$\$</sup>	111,4±5,5 <sup>\$\$\$</sup>	106,1±6,7 <sup>\$\$\$</sup> , <sup>†</sup>	48,4±2,8 <sup>\$</sup>
<i>UAE</i> , 38 min	12,6±0,5 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	6,7±0,3 <sup>&amp;&amp;</sup>	110,3±6,8 <sup>&amp;&amp;</sup>	96,0±6,3 <sup>&amp;</sup>	44,6±5,7 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>

(\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  и \*\*\*  $p < 0,001$  у поређењу са мацерацијом 10 min; #  $p < 0,05$  и ###  $p < 0,001$  у поређењу са мацерацијом 20 min; \$  $p < 0,01$ , \$\$  $p < 0,01$  и \$\$\$  $p < 0,001$  у поређењу са мацерацијом 30 min; &  $p < 0,05$ , &&  $p < 0,01$  и &&&  $p < 0,001$  у поређењу са мацерацијом 38 min; †  $p < 0,05$ , ††  $p < 0,01$ , †††  $p < 0,001$  у поређењу са *UAE* 38 min)

µg *CAE*/mL – изражено на садржај кафеене киселине (*CAE*, енгл. caffeic acid equivalents)

**Табела 4.5.** Антиоксидативни капацитет мерен *DPPH*, *TEAC* и *FRAP* методом у 54%-тним метанолним екстрактима листа коприве припремљеним мацерацијом и ултразвучном екстракцијом (*UAE*) при различитим трајањима екстракције

Узорак	<i>DPPH</i> , <i>EC</i> <sub>50</sub> mg/mL	<i>TEAC</i> , μmol TE/g	<i>FRAP</i> , μmol Fe <sup>2+</sup> /g
Мацерација, 10 min	0,333±0,015	372,8±4,1	78,8±1,2
Мацерација, 20 min	0,293±0,009	414,3±4,8	89,7±0,4
Мацерација, 30 min	0,337±0,049	438,0±3,1	90,6±0,5
Мацерација, 38 min	0,323±0,042	609,3±7,8	89,6±3,0
<i>UAE</i> , 10 min	0,240±0,028 <sup>***</sup>	613,2±9,4 <sup>***, †††</sup>	91,2±0,1 <sup>*, †</sup>
<i>UAE</i> , 20 min	0,233±0,009 <sup>#</sup>	603,1±1,6 <sup>###, †††</sup>	88,1±5,5 <sup>††</sup>
<i>UAE</i> , 30 min	0,226±0,006 <sup>\$\$\$</sup>	742,3±16,5 <sup>\$\$\$</sup>	99,5±2,2
<i>UAE</i> , 38 min	0,240±0,014 <sup>&amp;&amp;</sup>	732,2±2,9 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	101,3±5,3 <sup>&amp;</sup>

(\*  $p < 0,05$  и \*\*\*  $p < 0,001$  у поређењу са мацерацијом 10 min; #  $p < 0,05$ , и ###  $p < 0,001$  у поређењу са 20 min мацерацијом; \$\$\$  $p < 0,001$  у поређењу са мацерацијом 30 min; &  $p < 0,05$ , &&  $p < 0,01$  и &&&  $p < 0,001$  у поређењу са мацерацијом 38 min; †  $p < 0,05$ , ††  $p < 0,01$ , †††  $p < 0,001$  у поређењу са *UAE* 38 min)

Даље је 54%-тни метанолни екстракт припремљен ултразвучном екстракцијом у трајању од 38 min лиофилизован и добијен је сув екстракт (*UE*) којем је одређен антиоксидативни капацитет *FRAP* и *TEAC* методама, способност неутралисања супероксидног радикала, способност хелирања јона гвожђа, садржај нитрита као и садржај хлорогенске, 2-*O*-кафеоил малне киселине и рутина (Табеле 4.6.). Антиоксидативни капацитет *UE*, мерен *FRAP* методом, је био око два пута виши од антиоксидативног капацитета *BHT* ( $p < 0,001$ ), док је у поређењу са витамином Ц, антиоксидативни капацитет *UE* био око 6 пута нижи ( $p < 0,001$ ). Слично, мерен

---

*TEAC* методом, антиоксидативни капацитет *UE* је био троструко већи од антиоксидативног капацитета *BHT* ( $p < 0,001$ ). Насупрот томе, у поређењу са витамином Ц, *TEAC* антиоксидативни капацитет *UE* је био скоро 5 пута нижи ( $p < 0,001$ ). Слично, способност неутралисања супероксидног радикала од стране *UE* је била скоро двадесет пута нижа у поређењу са витамином Ц ( $p < 0,001$ ). Способност *UE* да хелира јоне метала је поређена са *EDTA* и показало се да је око 18 пута нижа у односу на способност хелирања јона метала коју је испољио *EDTA* ( $p < 0,001$ ). Садржај хлорогенске, 2-*O*-кафеоил малне киселине и рутина у *UE* је износио 15,3, 12,29 и 6,01 mg/g, док је садржај нитрита износио 14,72 mg/g.



**Табела 4.6.** Антиоксидативни капацитет мерен *FRAP* и *TEAC* методом, способност неутралисања супероксидног радикала, способност хелирања јона гвожђа и садржај нитрита у *UE*

	<i>FRAP</i> , mmol Fe <sup>2+</sup> /g	<i>TEAC</i> , mmol <i>TE</i> /g	Способност неутралисања супероксидног радикала, <i>EC</i> <sub>50</sub> , mg/mL	Способност хелирања јона гвожђа, <i>EC</i> <sub>50</sub> , mg/mL	Садржај нитрита, mg/g
<i>UE</i>	0,993±0,018 <sup>***,###</sup>	1,5±0,1 <sup>***,###</sup>	1,15±0,02 <sup>###</sup>	241,6±0,0 <sup>\$\$\$</sup>	14,72
<i>EDTA</i>	н.о.	н.о.	н.о.	13,7±0,1	н.о.
Витамин Ц	6,57±1,00	7,23±0,28	0,06±0,00	н.о.	н.о.
<i>BHT</i>	0,416±0,020	0,467±0,005	н.о.	н.о.	н.о.

(<sup>\*\*\*</sup>  $p < 0,001$  у поређењу са *BHT*; <sup>###</sup>  $p < 0,001$  у поређењу са витамином *C*; <sup>\$\$\$</sup>  $p < 0,001$  у поређењу са *EDTA*)

н.о. - није одређивано

## 4.2. Ефекти *in vivo* третмана са екстрактом листа *Urtica dioica* L.

У другој фази експеримента вршено је испитивање ефеката четворонедељног третмана са три *UE* дозе (10, 50 и 200 mg/kg на дан) и терапије лосартаном (10 mg/kg на дан) на хемодинамске и биохемијске параметре, као и на оксидативни статус *SHR*.

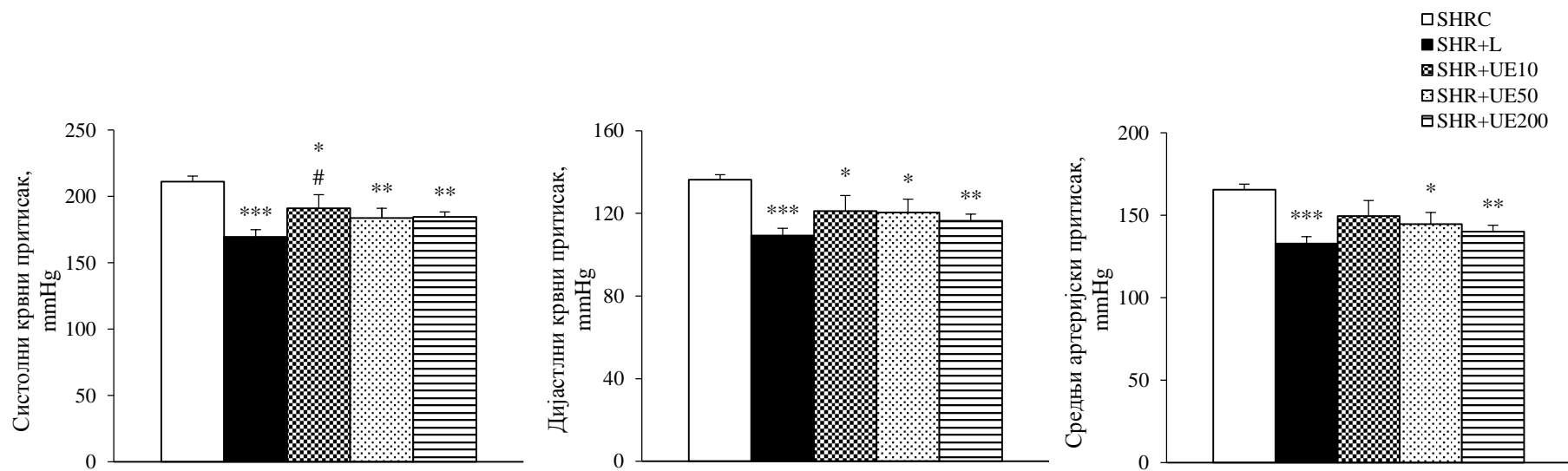
### 4.2.1. Хемодинамски параметри

Резултати хемодинамских мерења приказани су на сликама 4.4 и 4.5. Као што је и очекивано, хронична терапија лосартаном у дози од 10 mg/kg на дан је довела до значајног снижења систолног, дијастолног и средњег артеријског притиска код *SHR* у поређењу са контролном групом ( $p < 0,001$ ). Третман најнижом *UE* дозом довео је до значајног снижења систолног и дијастолног крвног притиска у односу на контролну групу ( $p < 0,05$ ). Међутим, и поред снижења, систолни крвни притисак код ове групе је био значајно виши него код групе која је примала лосартанску терапију ( $p < 0,05$ ). Слично, у групи која је примала дневну дозу *UE* од 50 mg/kg је дошло до значајног пада систолног, дијастолног и средњег артеријског крвног притиска у односу на вредности забележене у контролној групи ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$  и  $p < 0,05$ , за систолни, дијастолни и средњи артеријски крвни притисак, редом). Тенденција снижења вредности систолног, дијастолног и средњег крвног притисака се поновила и код третмана са највишом *UE* дозом ( $p < 0,01$ ). До значајног снижења минутног волумена срца је дошло након третмана са све три *UE* дозе у поређењу са контролном групом ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,05$  и  $p < 0,01$ , за *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200*, редом), док су третмани са 50 и 200 mg/kg *UE* на дан довели до значајног снижења овог параметра и у односу на групу третирану лосартаном ( $p < 0,05$  и  $p < 0,01$ , за *SHR+UE50* и *SHR+UE200*, редом). Терапија лосартаном није довела до промене минутног волумена срца у односу на контролну групу. Једино код групе

---

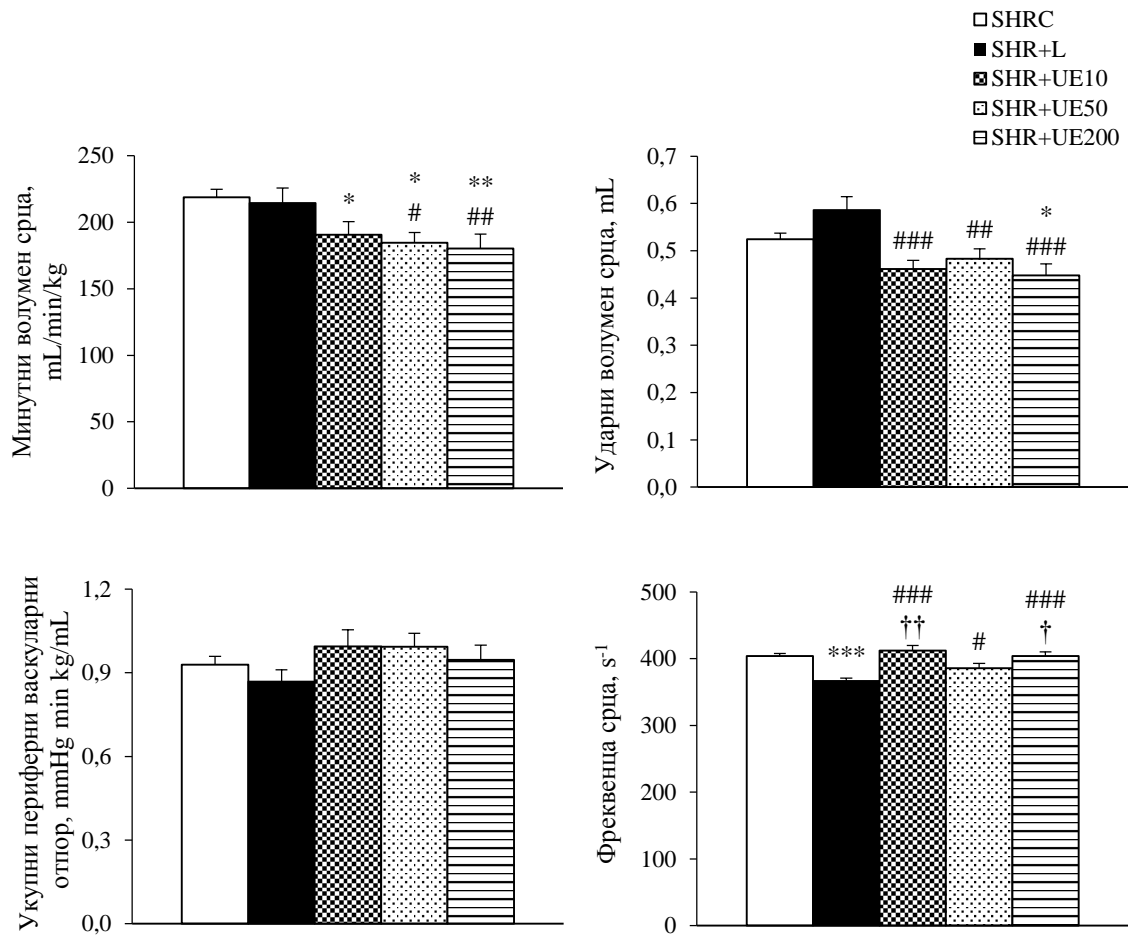
третиране највишом *UE* дозом 200 mg/kg је дошло до значајног снижења ударног волумена срца у поређењу са контролном групом ( $p < 0,05$ ) док су све три *UE* дозе довеле до значајног снижења овог параметра у односу на групу која је примала лосартанску терапију ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$  и  $p < 0,001$ , за *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200*, редом). Срчана фреквенца била је једино значајно снижена у групи која је третирана лосартаном, како у односу на вредност овог параметра код контролне групе ( $p < 0,001$ ), тако и у односу на вредности код група третираних са све три *UE* дозе ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,05$  и  $p < 0,001$ , за *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200*, редом). Група третирана са *UE* дозом од 50 mg/kg је имала значајно нижу вредност срчане фреквенце од група третираних најнижом и највишом *UE* дозом ( $p < 0,01$  и  $p < 0,05$ , за *SHR+UE10* и *SHR+UE200*, редом). Није било промена у укупном периферном васкуларном отпору након третмана са све три *UE* дозе, као ни након лосартанске терапије.

Ниједна *UE* доза, као ни терапија лосартаном није довела до промене у протоцима кроз каротидну, реналну артерију и аорту, као ни до промене отпора протоку кроз ова васкуларна корита у поређењу са контролном групом (Слика 4.6.). У групи третираној најнижом *UE* дозом проток крви кроз реналну артерију је био значајно нижи него код групе која је примала лосартанску терапију ( $p < 0,05$ ). Најнижа *UE* доза је довела до значајног повећања протока крви кроз аорту у поређењу са групом која је примала 200 mg/kg *UE* ( $p < 0,05$ ), као и до значајног смањења отпора протоку крви кроз аорту у поређењу са групом која је примала 50 mg/kg *UE* ( $p < 0,01$ ).



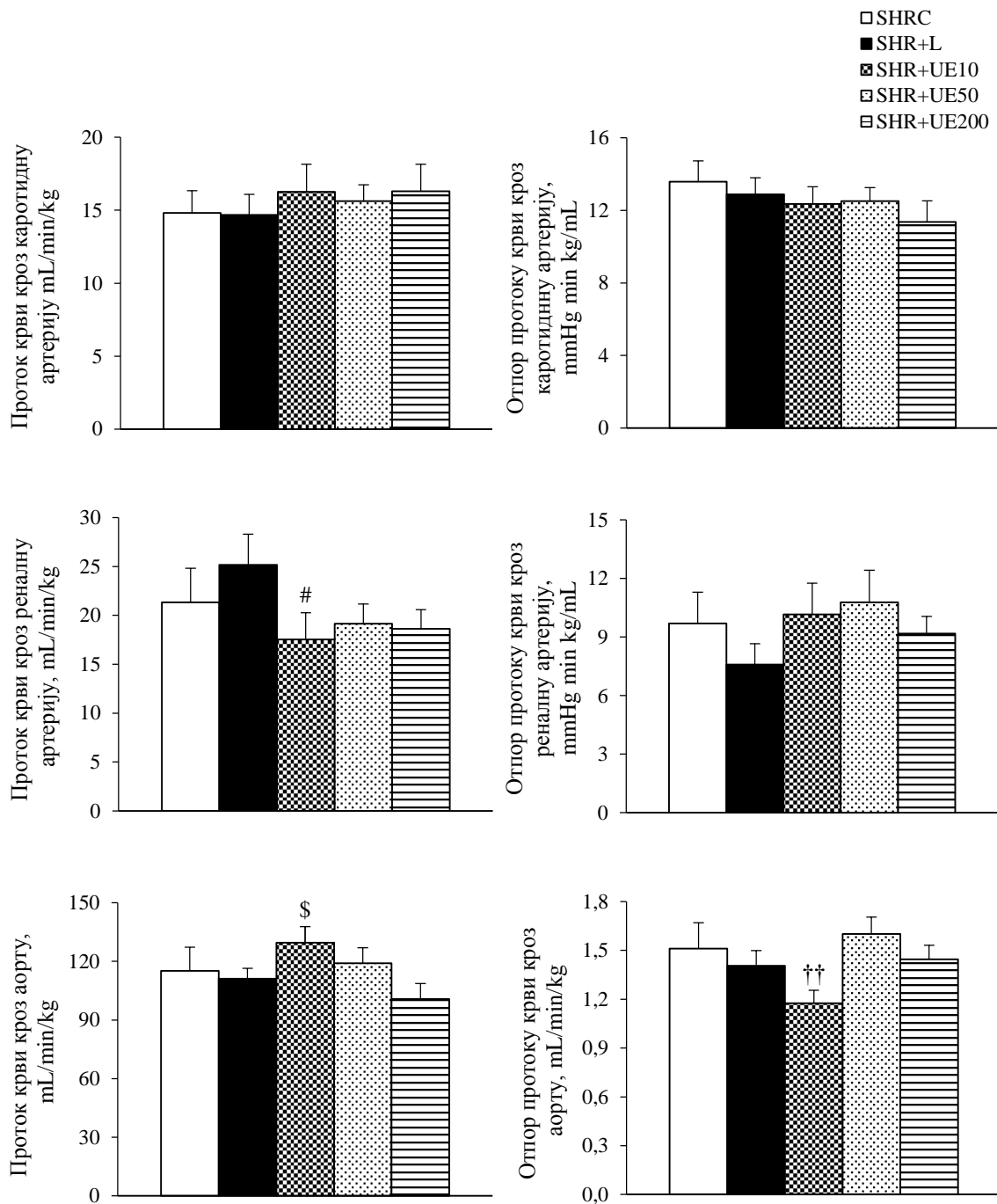
**Слика 4.4.** Систолни, дијастолни и средњи артеријски притисак код експерименталних животиња

SHR – спонтано хипертензивни пацови, SHRC - контролна група, SHR+L - позитивна контролна група (10 mg/kg на дан лосартан), SHR+UE10, SHR+UE50 и SHR+UE200 - групе које су примале UE у дози од 10, 50 и 200 mg/kg на дан, редом (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  и \*\*\*  $p < 0,001$  у поређењу са SHRC и #  $p < 0,05$  у поређењу са SHR+L)



**Слика 4.5.** Минутни волумен срца, ударни волумен срца, укупни периферни васкуларни отпор и фреквенца срца код експерименталних животиња

*SHR* – спонтано хипертензивни пацови, *SHRC* - контролна група, *SHR+L* - позитивна контролна група (10 mg/kg на дан лосартана), *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200* - групе које су примале *UE* у дози од 10, 50 и 200 mg/kg на дан, редом (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  и \*\*\*  $p < 0,001$  у поређењу са *SHRC*, #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  и ###  $p < 0,001$  у поређењу са *SHR+L* и †  $p < 0,05$  и ††  $p < 0,01$  у поређењу са *SHR+UE50*).



**Слика 4.6.** Проток крви кроз каротидну, реналну артерију и аорту и отпор протоку крви кроз каротидну, реналну артерију и аорту код експерименталних животиња

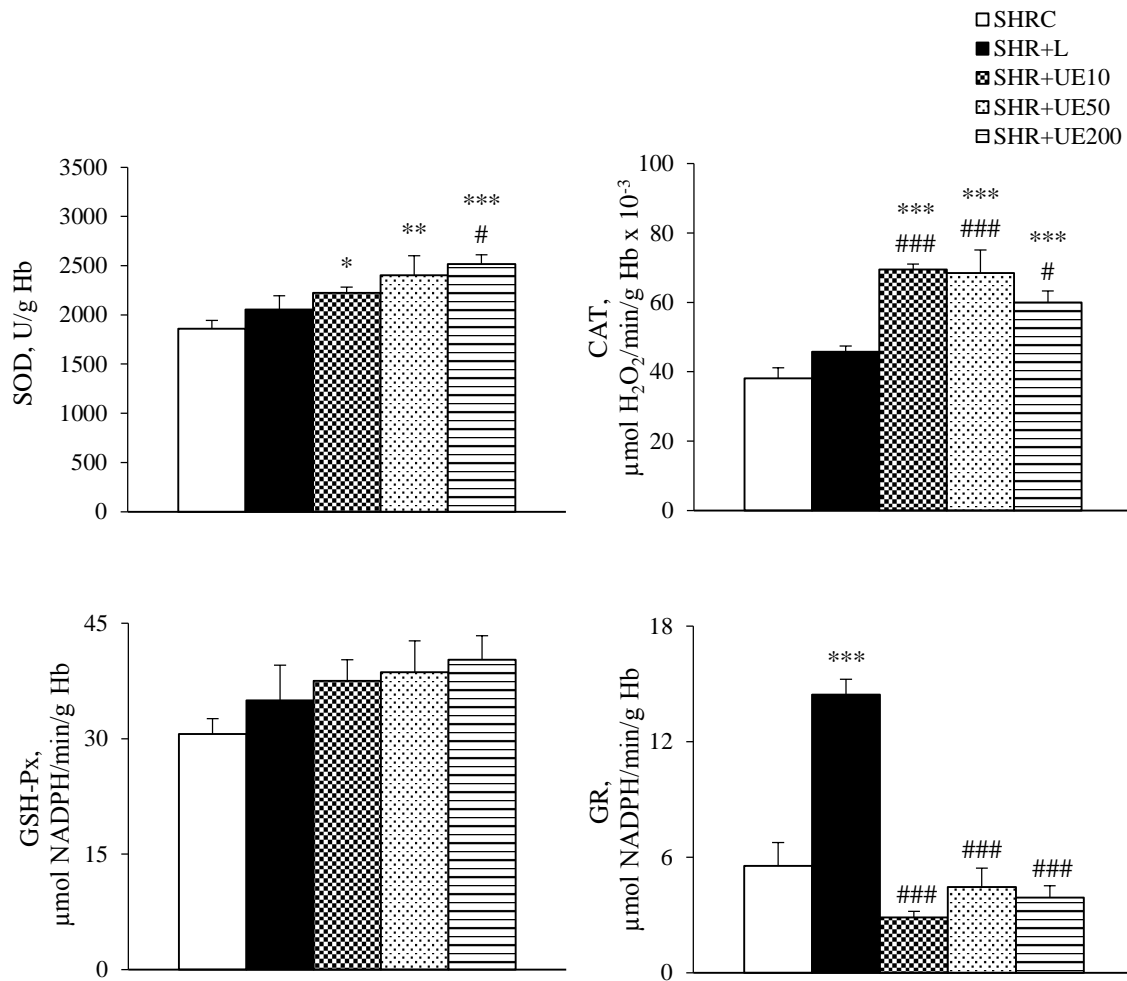
*SHR* - спонтано хипертензивни пацови, *SHRC* - контролна група, *SHR+L* - позитивна контролна група (10 mg/kg на дан лосартан), *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200* - групе које су примале *UE* у дози од 10, 50 и 200 mg/kg на дан, редом (<sup>#</sup>  $p < 0,05$  у поређењу са *SHR+L*, <sup>††</sup>  $p < 0,01$  у поређењу са *SHR+UE50* и <sup>\$</sup>  $p < 0,05$  у поређењу са *SHR+UE200*)

#### 4.2.2. Оксидативни статус и антиоксидативни капацитет

У овом поглављу су представљени ефекти третмана са три *UE* дозе и терапије лосартаном на активности (Слика 4.7.) и експресију (Слика 4.8.) ензима *SOD*, *CAT*, *GSH-Px* и *GR* у еритроцитима *SHR*, антиоксидативни капацитет плазме (Слика 4.9.), као и на системски оксидативни стрес (Слика 4.10.).

##### 4.2.2.1. Активност и експресија ензима антиоксидативне заштите у еритроцитима

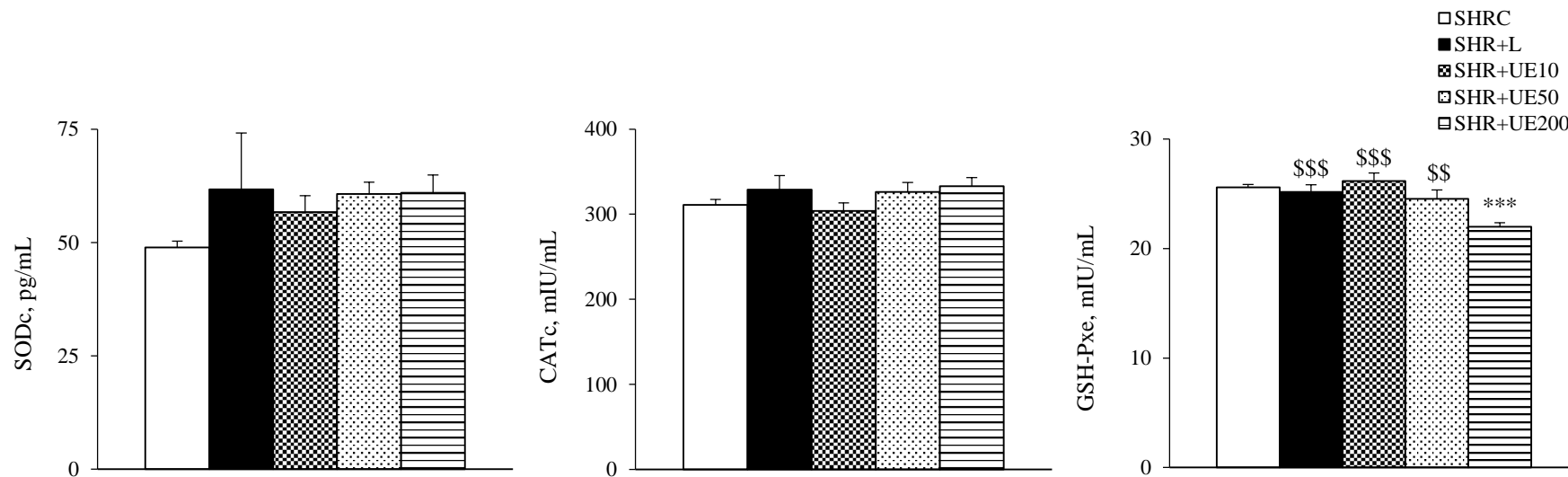
Третман са све три *UE* дозе је довео до значајног повећања активности *SOD* у еритроцитима у поређењу са контролном групом ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  и  $p < 0,001$ , за *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200*). Третман са највишом *UE* дозом је значајно повисио *SOD* активност у еритроцитима у поређењу са групом која је примала терапију лосартаном ( $p < 0,05$ ). Активност *CAT* у еритроцитима је била значајно виша код све три *UE* третиране групе у односу на контролну групу ( $p < 0,001$ ), као и у односу на активност код групе која је примала терапију лосартаном ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$  и  $p < 0,05$ , за *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200*). Активност *GSH-Px* у еритроцитима је била непромењена код *UE* третираних група. Терапија лосартаном није довела до промене активности *SOD*, *CAT* и *GSH-Px* у еритроцитима. Третман са *UE* није довео до промене активности *GR* у еритроцитима у односу на контролну вредност, док је терапија лосартаном довела до значајног повећања активности овог ензима у поређењу са контролном групом ( $p < 0,001$ ), али и у поређењу са све три *UE* третиране групе ( $p < 0,001$ ). Третман са све три *UE* дозе и терапија лосартаном нису имали ефекат на експресију *SOD* и *CAT* у еритроцитима у поређењу са контролном групом. С друге стране, експресија *GSH-Px* у еритроцитима је била значајно снижена у групи третираној са највишом *UE* дозом у односу на контролну групу ( $p < 0,001$ ), као и у односу на групе третиране са 10 и 50 mg/kg *UE* ( $p < 0,001$  и  $p < 0,01$ , за *SHR+UE10* и *SHR+UE50*), али и у поређењу са лосартаном ( $p < 0,001$ ).



**Слика 4.7.** Активност ензима антиоксидативне заштите супероксид дисмутазе (SOD), каталазе (CAT), глутатион пероксидазе (GSH-Px) и глутатион редуктазе (GR) у еритроцитима експерименталних животиња

SHR – спонтано хипертензивни пацови, SHRC - контролна група, SHR+L - позитивна контролна група (10 mg/kg на дан лосартан), SHR+UE10, SHR+UE50 и SHR+UE200 - групе које су примале UE у дози од 10, 50 и 200 mg/kg на дан, редом (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  и \*\*\*  $p < 0,001$  у поређењу са SHRC и #  $p < 0,05$  и ###  $p < 0,001$  у поређењу са SHR+L)



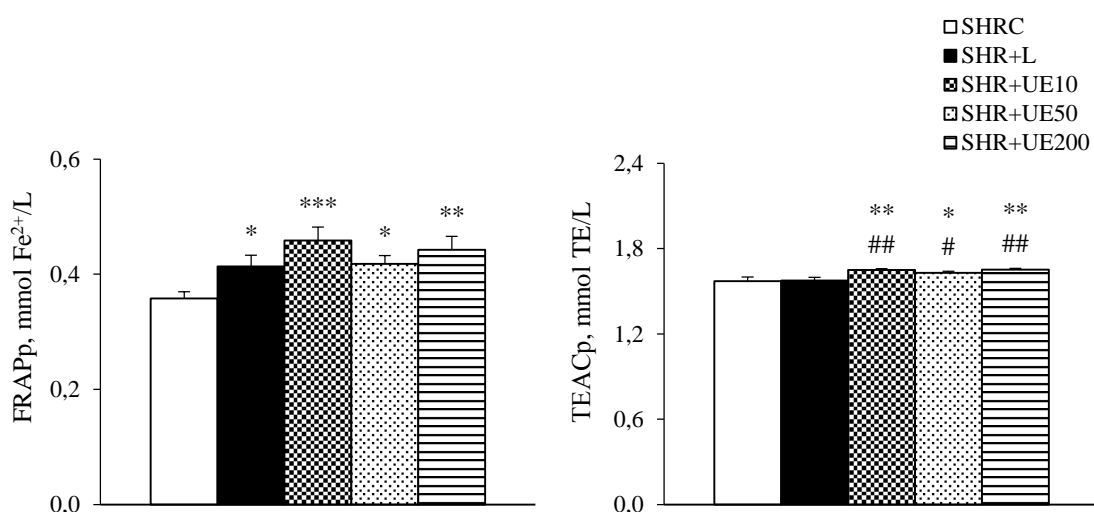


**Слика 4.8.** Експресија супероксид дисмутазе (*SODc*), каталазе (*CATc*) и глутатион пероксидазе (*GSH-Pxc*) у еритроцитима експерименталних животиња

*SHR* – спонтано хипертензивни пацови, *SHRC* - контролна група, *SHR+L* - позитивна контролна група (10 mg/kg на дан лосартан), *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200* - групе које су примале *UE* у дози од 10, 50 и 200 mg/kg на дан, редом (\*\*\*)  $p < 0,001$  у поређењу са *SHRC* и  $^{ss} p < 0,01$  и  $^{sss} p < 0,001$  у поређењу са *SHR+UE200*)

#### 4.2.2.2. Антиоксидативни капацитет плазме и степен липидне пероксидације

Терапија лосартаном и третмани са 10, 50 и 200 mg/kg *UE* су довели до повећања *FRAPp* антиоксидативног капацитета плазме у поређењу са контролном групом ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,05$  и  $p < 0,01$ , за *SHR+L*, *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200*). Слично, третман са све три *UE* дозе је довео до значајног повећања *TEACp* антиоксидативног капацитета плазме у односу на контролну групу ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$  и  $p < 0,01$ , за *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200*). Такође, третман са све три *UE* дозе је довео и до значајног повећања *TEACp* вредности у поређењу са групом која



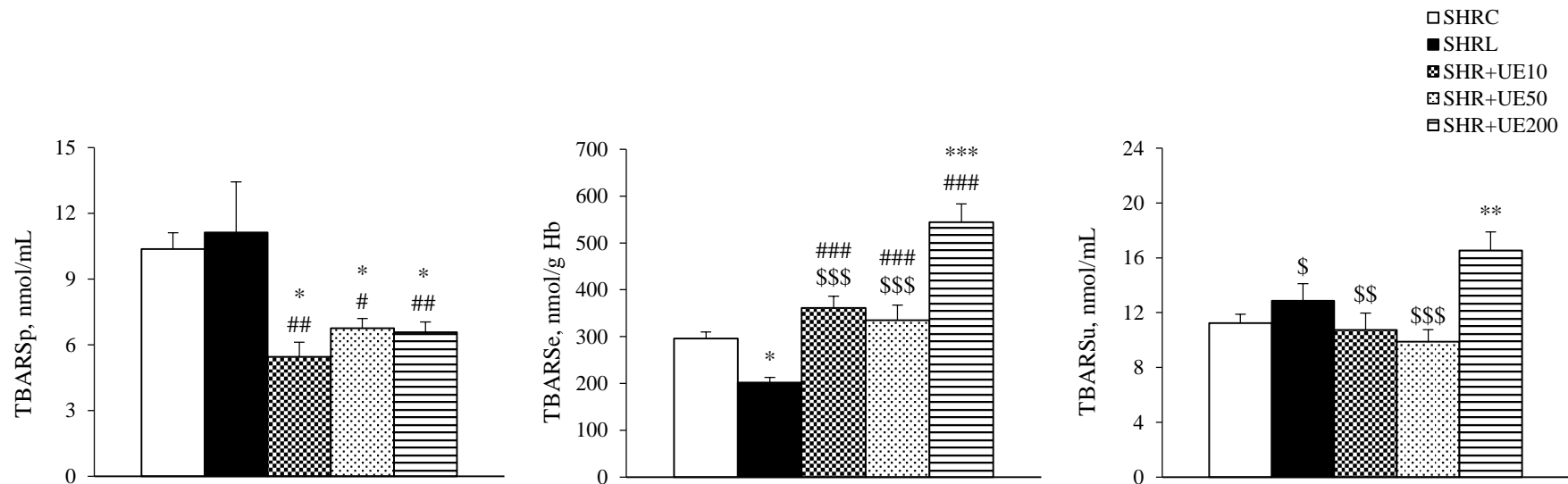
Слика 4.9. Антиоксидативни капацитет плазме (*FRAPp* и *TEACp*) код експерименталних животиња

*SHR* – спонтано хипертензивни пацови, *SHRC* - контролна група, *SHR+L* - позитивна контролна група (10 mg/kg на дан лосартан), *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200* - групе које су примале *UE* у дози од 10, 50 и 200 mg/kg на дан, редом (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  и \*\*\*  $p < 0,001$  у поређењу са *SHRC* и #  $p < 0,05$  и ##  $p < 0,01$  у поређењу са *SHR+L*)

---

је примала терапију лосартаном ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$  и  $p < 0,01$ , за *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200*).

Код све три групе третиране са *UE* (10, 50 и 200 mg/kg) је дошло до снижења *TBARSp* вредности како у односу на контролну ( $p < 0,05$ ), тако и у односу на групу која је примала лосартанску терапију ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$  и  $p < 0,01$ , за *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200*). Вредност *TBARSe* је била значајно снижена у групи која је примала терапију лосартаном у поређењу са контролном групом ( $p < 0,05$ ), као и у поређењу са све три *UE* третиране групе ( $p < 0,001$ ). Третман са највишом *UE* дозом је довео до значајног повећања вредности *TBARSe* у поређењу са вредношћу овог параметра код контролне групе ( $p < 0,001$ ), али и у поређењу са групама третираним нижим *UE* дозама ( $p < 0,001$ ). Слично, код групе која је примала 200 mg/kg на дан *UE* је дошло до значајног повећања вредности *TBARSi*, како у односу на ову вредност код контролне групе ( $p < 0,01$ ), тако и у односу на вредност код група које су примале 10 и 50 mg/kg *UE*, као и у односу на групу која је примала терапију лосартаном ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  и  $p < 0,001$ , за *SHR+L*, *SHR+UE10* и *SHR+UE50*). Код група које су примале 10 и 50 mg/kg *UE* дневно није било промена *TBARSe* и *TBARSi* при поређењу са овим вредностима код контролне групе.



**Слика 4.10.** Степен липидне пероксидације у плазми (*TBARSp*), еритроцитима (*TBARSe*) и урину (*TBARSu*) код експерименталних животиња

*SHR* – спонтано хипертензивни пацови, *SHRC* - контролна група, *SHR+L* - позитивна контролна група (10 mg/kg на дан лосартан), *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200* - групе које су примале *UE* у дози од 10, 50 и 200 mg/kg на дан, редом (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  и \*\*\*  $p < 0,001$  у поређењу са *SHRC*, #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  и ###  $p < 0,001$  у поређењу са *SHR+L* и \$  $p < 0,05$ , \$\$  $p < 0,01$  и \$\$\$  $p < 0,001$  у поређењу са *SHR+UE200*)

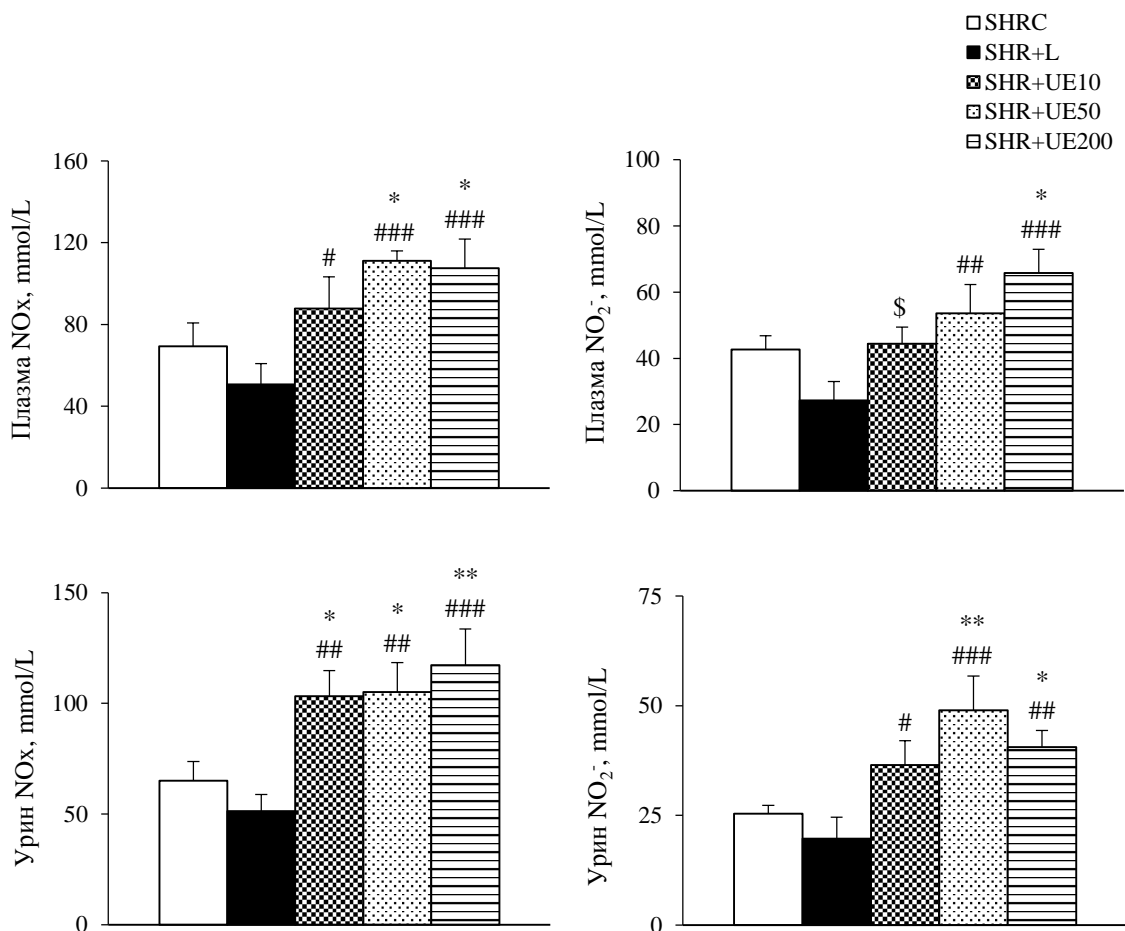
### 4.2.3. Биохемијски параметри

#### 4.2.3.1. Ниво нитрита и нитрата у плазми и екскреција нитрита и нитрата урином

На слици 4.11. приказани су ефекти третмана са све три *UE* дозе и терапије лосартаном на садржај  $NO_x$ , као и на концентрацију  $NO_2^-$  у плазми и урину експерименталних животиња.

Третман са *UE* у дози од 50 и 200 mg/kg на дан је довео до значајног повећања садржаја  $NO_x$  у плазми у поређењу са контролном групом ( $p < 0,05$ ), док је третман са све три *UE* дозе довео до значајног повећања овог параметра у односу на групу која је примала лосартанску терапију ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$  и  $p < 0,001$ , за *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200*). У односу на контролну групу, концентрација  $NO_2^-$  у плазми је била повишена само код групе која је примала дневну дозу од 200 mg/kg *UE* ( $p < 0,05$ ). Третман са две највише *UE* дозе је довео до значајног повећања  $NO_2^-$  у плазми у поређењу са групом која је примала терапију лосартаном ( $p < 0,01$  и  $p < 0,001$ , за *SHR+UE50* и *SHR+UE200*), док је ова вредност код групе која је примала 10 mg/kg *UE* била значајно нижа у поређењу са групом која је примала највишу *UE* дозу ( $p < 0,05$ ).

С друге стране, садржај  $NO_x$  у урину је био значајно виши код све три групе третиране са *UE* у поређењу са контролном групом ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,05$  и  $p < 0,01$ , за *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200*), као и у односу на лосартанску групу ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,01$  и  $p < 0,001$ , за *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200*). Концентрација  $NO_2^-$  у урину је била значајно виша након третмана са вишим *UE* дозама у поређењу са вредностима у контролној групи ( $p < 0,01$  и  $p < 0,05$ , за *SHR+UE50* и *SHR+UE200*), док је у односу на лосартанску групу била повишена након третмана са све три *UE* дозе ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$  и  $p < 0,01$ , за *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200*).



**Слика 4.11.** Концентрације укупних нитрата и нитрита ( $NO_x$ ) и нитрита ( $NO_2^-$ ) у плазми и урину експерименталних животиња

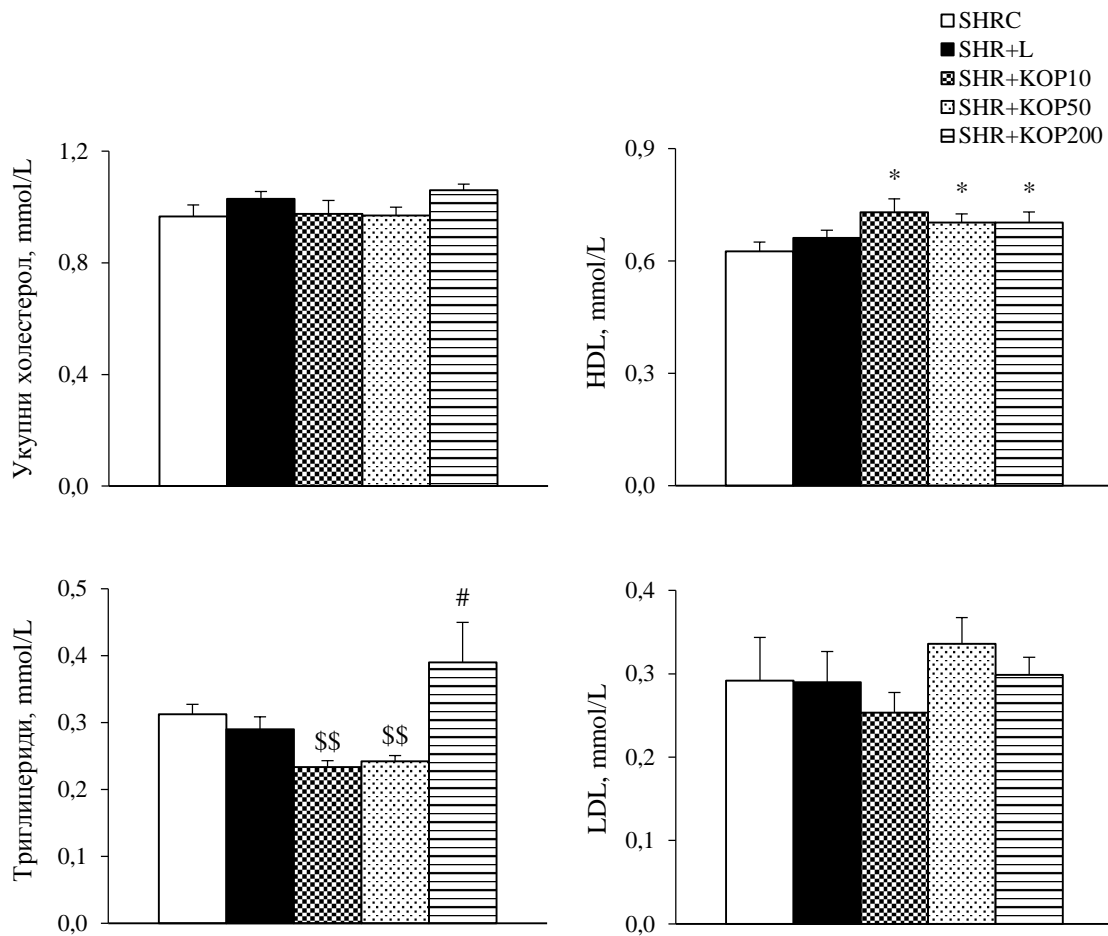
SHR – спонтано хипертензивни пацови, SHRC - контролна група, SHR+L - позитивна контролна група (10 mg/kg на дан лосартан), SHR+UE10, SHR+UE50 и SHR+UE200 - групе које су примале UE у дози од 10, 50 и 200 mg/kg на дан, редом (\*  $p < 0,05$  и \*\*  $p < 0,01$  у поређењу са SHRC и #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  и ###  $p < 0,001$  у поређењу са SHR+L)

#### 4.2.3.2. Липидни статус

На сликама 4.12. и 4.13. су приказани ефекти третмана са све три UE дозе и терапије лосартаном на липидни статус, као и на однос укупног холестерола/HDL као и LDL/HDL однос у плазми експерименталних животиња.

---

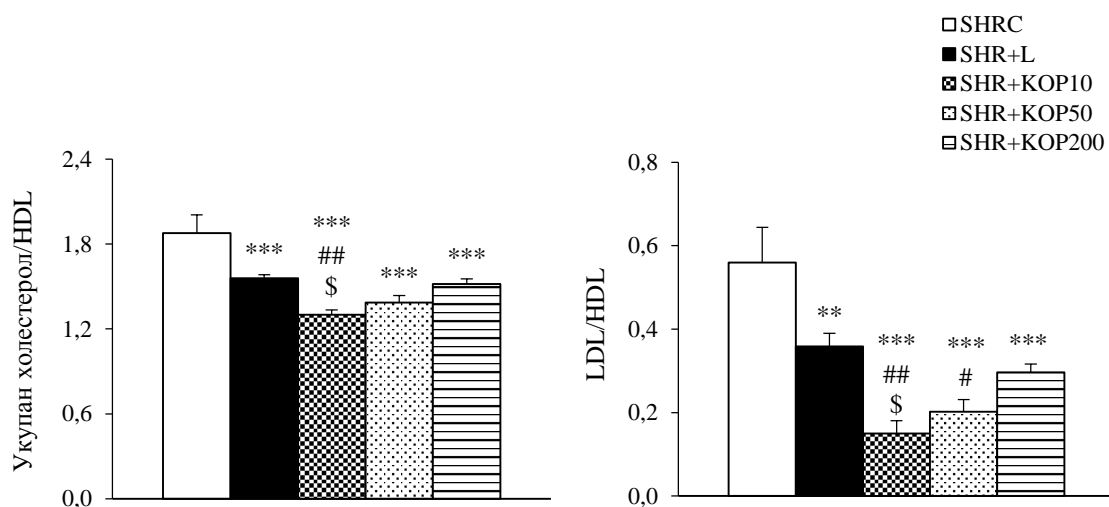
*UE* третман је без обзира на дозу, значајно повисио *HDL* у плазми у поређењу са контролом ( $p < 0,05$ ). Насупрот томе, ни *UE* третман ни лосартанска терапија нису довеле до промене триглицерида, укупног холестерола, као ни *LDL* у односу на контролну групу. Међутим, код групе која је примала *UE* у дози од 200 mg/kg на дан, концентрација триглицерида је била значајно виша него код групе која је примала терапију лосартаном ( $p < 0,05$ ), као и код група које су биле третиране са две ниже *UE* дозе ( $p < 0,01$ ). Однос укупан холестерол/*HDL* у плазми је након третмана са све три *UE* дозе био значајно снижен у односу на контролну групу ( $p < 0,001$ ). Слично, терапија лосартаном је такође довела до значајног снижења овог односа у поређењу са контролом ( $p < 0,001$ ). Код групе која је примала *UE* у дози од 10 mg/kg на дан, снижење односа укупан холестерол/*HDL* је било највеће и значајно ниже у односу на групу која је примала лосартан ( $p < 0,01$ ) као и *UE* дозу од 200 mg/kg дневно ( $p < 0,05$ ). Такође, однос *LDL/HDL* је био значајно снижен у поређењу са контролном групом након третмана са све три *UE* дозе ( $p < 0,001$ ), као и после терапије са лосартаном ( $p < 0,01$ ). Група која је примала 10 mg/kg *UE* је имала највеће снижење односа *LDL/HDL* које се значајно разликовало у поређењу са вредностима код група које су примале лосартан ( $p < 0,01$ ) и 200 mg/kg *UE* на дан ( $p < 0,05$ ), док је ова вредност код групе која је примала 50 mg/kg *UE* била значајно нижа у поређењу са групом која је примала терапију лосартаном ( $p < 0,05$ ).



**Слика 4.12.** Концентрације укупног холестерола, *HDL*, триглицерида и *LDL* у плазми експерименталних животиња

*SHR* – спонтано хипертензивни пацови, *SHRC* - контролна група, *SHR+L* - позитивна контролна група (10 mg/kg на дан лосартан), *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200* - групе које су примале *UE* у дози од 10, 50 и 200 mg/kg на дан, редом (\*  $p < 0,05$  у поређењу са *SHRC*, #  $p < 0,05$  у поређењу са *SHR+L* и <sup>ss</sup>  $p < 0,01$  у поређењу са *SHR+UE200*)





**Слика 4.13.** Односи укупан холестерол/*HDL* и *LDL/HDL* у плазми експерименталних животиња

*SHR* – спонтано хипертензивни пацови, *SHRC* - контролна група, *SHR+L* - позитивна контролна група (10 mg/kg на дан лосартан), *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200* - групе које су примале *UE* у дози од 10, 50 и 200 mg/kg на дан, редом (\*\*  $p < 0,01$  и \*\*\*  $p < 0,001$  у поређењу са *SHRC*, #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  у поређењу са *SHR+L* и \$  $p < 0,05$  у поређењу са *SHR+UE200*)

#### 4.2.3.3. Остали биохемијски параметри

Третман са све три *UE* дозе као и терапија лосартаном нису довели до промена вредности параметара функције јетре (*ALT*, *AST*, *LDH*, *GLDH* и билирубина), као ни параметара функције бубрега ( $C_{Cr}$  и  $C_U$ , протеина и албумина у урину). Остали биохемијски параметри (глукоза, мокраћна киселина, гвожђе, *UIBC* и липаза) су остали такође непромењени.

У табели 4.7. су приказани ефекти третмана са све три *UE* дозе и терапије лосартаном на биохемијске параметре у плазми и урину експерименталних животиња.

Табела 4.7. Биохемијски параметри у плазми и урину експерименталних животиња

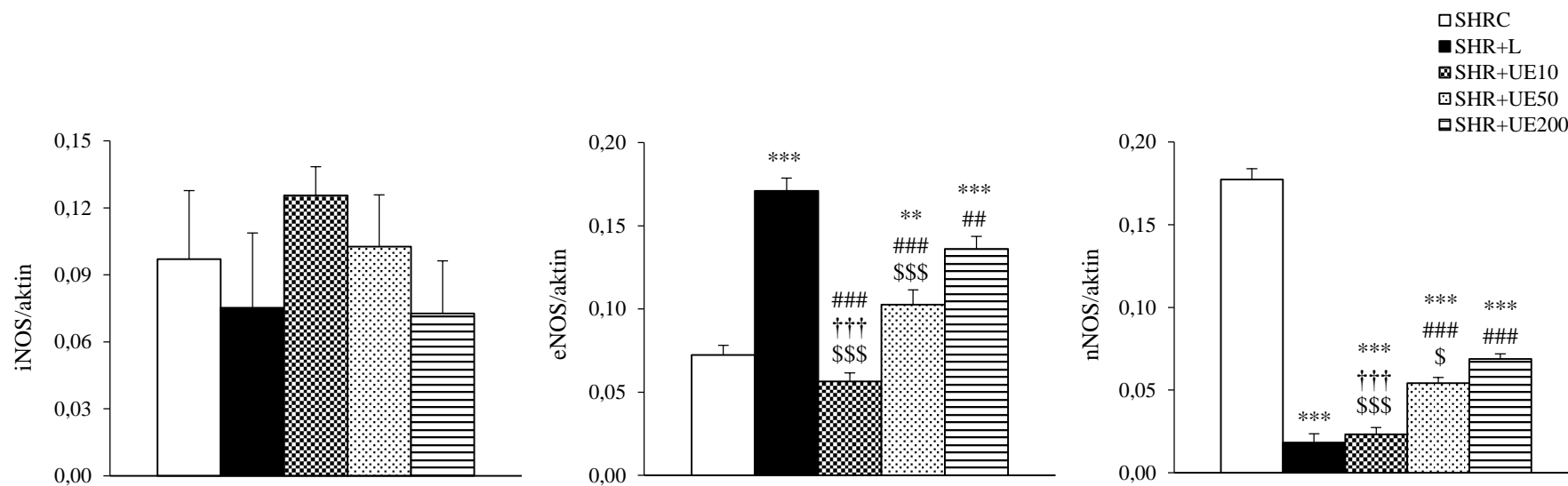
	<i>SHRC</i>	<i>SHR+L</i>	<i>SHR+KOP10</i>	<i>SHR+KOP50</i>	<i>SHR+KOP200</i>
Глукоза, mmol/L	14,12±0,44	14,98±0,64	14,84±0,49	12,39±1,13	15,13±0,47
Мокраћна киселина, μmol/L	65,80±9,01	44,08±15,20	53,65±13,62	52,24±17,95	79,75±20,53
Гвожђе, μmol/L	27,88±2,42	29,72±1,52	26,20±1,04	31,46±2,50	32,20±1,09
<i>UIBC</i> , μmol/L	56,49±3,78	53,74±1,80	54,41±2,96	42,95±2,10	63,14±2,83
Липаза, U/L	14,12±0,44	14,98±0,64	14,84±0,49	12,39±1,13	15,13±0,47
<i>ALT</i> , U/L	184±40	138±21	169±38	120±15	134±23
<i>AST</i> , U/L	397±59	334±45	461±97	494±68	315±49
<i>LDH</i> , U/L	1213±315	713±132	969±193	883±153	863±137
<i>GLDH</i> , U/L	38,0±5,0	34,7±8,0	42,9±6,0	40,4±8,0	27,4±5,0
<i>BIL-T</i> , μmol/L	0,88±0,18	0,88±0,45	0,50±0,06	0,62±0,10	0,78±0,06
$C_U$ , mL/min/kg	2,49±0,15	2,76±0,35	2,12±0,44	2,35±0,22	1,83±0,12
$C_{Cr}$ , mL/min/kg	2,42±0,19	3,04±0,29	2,34±0,14	2,73±0,20	1,86±0,30
Протеини у урину, g/L	1,78±0,18	1,26±0,12	1,73±0,20	1,53±0,13	2,26±0,22
Албумини у урину, mg/L	22,48±5,17	30,36±3,05	24,99±2,71	28,94±2,66	30,08±0,89

*SHR* - спонтано хипертензивни пацови, *SHRC* - контролна група, *SHR+L* - позитивна контролна група (10 mg/kg на дан лосартан), *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200* - групе које су примале *UE* у дози од 10, 50 и 200 mg/kg на дан, редом ( $p < 0,05$  у поређењу са *SHRC*),  $C_{Cr}$  - клиренс креатинина,  $C_U$  - клиренс урее, *ALT* - аланин аминотрансфераза, *AST* - аспартат аминотрансфераза, *LDH* - лактат дехидрогеназа, *GLDH* - глутамат дехидрогеназа, *BIL-T* - билирубин укупни и *UIBC* - неасићени капацитет везивања гвожђа

#### 4.2.4. Експресија NOS ензима у бубрегу

На слици 4.14. је приказан утицај третмана са три различите *UE* дозе и терапије лосартаном на експресију *iNOS*, *eNOS* и *nNOS* у хомогенатима бубрега експерименталних животиња.

Третман са све три *UE* дозе, као и терапија лосартаном нису довели до значајне промене експресије *iNOS*-а у бубрегу експерименталних животиња. Насупрот томе, лосартан и две више *UE* дозе су довели до значајног повећања експресије *eNOS*-а у поређењу са контролном групом ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$  и  $p < 0,001$ , за *SHR+L*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200*). Најизраженије повећање експресије *eNOS*-а је уочено код лосартанске групе, и оно је било значајно више него код група третираних са 10, 50 и 200 mg/kg *UE* ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$  и  $p < 0,01$ , за *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200*). Поред тога, међу *UE* третираним групама је дошло до дозно-зависног повећања експресије овог ензима са повећањем *UE* дозе коришћене у третману (*SHR+UE10* у поређењу са *SHR+UE50* и *SHR+UE200*,  $p < 0,001$ ; *SHR+UE50* у поређењу са *SHR+UE200*,  $p < 0,001$ ). Супротно томе, у поређењу са контролном групом, експресија *nNOS* ензима је била значајно снижена код група третираних са *UE*, као и код групе која је примала лосартанску терапију ( $p < 0,001$ ). Такође, и у случају експресије *nNOS*, појавила се дозна зависност међу *UE* третираним групама где се са повећањем *UE* дозе повећала и експресија овог ензима (*SHR+UE10* у поређењу са *SHR+UE50* и *SHR+UE200*,  $p < 0,001$ ; *SHR+UE50* у поређењу са *SHR+UE200*,  $p < 0,05$ ). Третман са две више *UE* дозе је довео до значајно веће *nNOS* експресије него терапија лосартаном ( $p < 0,001$ ).



**Слика 4.14.** Експресија *iNOS*, *eNOS* и *nNOS* у бубрегу експерименталних животиња

*SHR* – спонтано хипертензивни пацови, *SHRC* - контролна група, *SHR+L* - позитивна контролна група (10 mg/kg на дан лосартан), *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200* - групе које су примале *UE* у дози од 10, 50 и 200 mg/kg на дан, редом (\*\*  $p < 0,01$  и \*\*\*  $p < 0,001$  у поређењу са *SHRC*, \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  у поређењу са *SHR+L*, †††  $p < 0,001$  у поређењу са *SHR+UE50* и \$  $p < 0,05$  и \$\$\$  $p < 0,001$  у поређењу са *SHR+UE200*)

---

## 5. Дискусија

У нашој студији *LC/MS* анализом 50%-тног метанолног екстракта листа коприве утврђено је присуство фенолних једињења која спадају у класу деривата хидроксициметне киселине (2-*O*-кафеоил мална киселина, хлорогенска киселина, кафеина киселина и *p*-кумароил малат), док су остала детектована фенолна једињења из групе флавоноида, конкретно гликозида флавонола (рутин, изокверцетин, кемферол-3-*O*-рутинозид, изорамнетин-3-*O*-рутинозид, и изорамнетин хексозид). При томе је утврђено да од свих фенолних једињења овај екстракт има највиши садржај рутина, хлорогенске и 2-*O*-кафеоил малне киселине. Наши резултати су у складу са литературним подацима где је показано да су најзаступљенија фенолна једињења листа коприве кафеина киселина и њени деривати (хлорогенска и кафеоил мална киселина), али и флавоноиди као што су кемферол, изорамнетин и кверцетин и то најчешће у облику 3-*O*-гликозида и то 3-*O*-рутинозида (Upton 2013). Поред тога, наши резултати су у сагласности и са резултатима студије Pinelli и сар. (2008) који су показали да 2-*O*-кафеоил мална киселина, хлорогенска киселина и рутин чине више од 80% укупних фенола листа коприве, док је рутин најзаступљенији флавонол. Тако је у поменутој студији *HPLC-DAD* анализа 75%-тног етанолног екстракта листа показала присуство хлорогенске, 2-*O*-кафеоил малне киселине, рутина, кемферол-3-*O*-рутинозида и изорамнетин-3-*O*-рутинозида. Слично, Grevsen и сар. (2008) су у 80%-тном метанолном екстракту листа и стабљике коприве идентификовали присуство хлорогенске киселине, али и других деривата кафеине киселине, као што су неохлаорогенска и 5-*O*-кафеоил мална киселина. Поред тога, у поменутој студији је детектована и 5-*O*-ферулоил хина киселина, док су од флавоноида идентификовани рутин, изокверцетин, кемферол-3-*O*-рутинозид и изорамнетин-3-*O*-рутинозид, као и кверцетин диглукозид. Да су рутин, хлорогенска и деривати кафеине киселине доминантна фенолна једињења листа коприве потврђују и резултати студије спроведене на узорцима коприве пореклом из медитеранског дела Турске (Otlés &

& Yalcin 2012). Поред поменутих једињења, у екстракту листа коприве су детектовани још и *p*-кумаринска киселина, кемферол и изораметин (Ogles & Yalcin 2012). Рутин је још једном потврђен као једно од 3 доминантна фенолна једињења у метанолном екстракту листа, заједно са кемферол-3-*O*-рутинозидом и изорамнетин-3-*O*-рутинозидом (Акбау et al., 2003). Такође, у студији која се бавила идентификацијом секундарних метаболита биљака из рода *Urtica*, у екстракту листа коприве идентифицирани су деривати кафеине киселине и рутин (Farag et al. 2013).

Фенолна једињења су комплексна класа једињења која се међусобно значајно разликују по хемијској структури. Као и у случају других једињења, хемијска структура им одређује растворљивост, тако да су број *C* атома и хидроксилних група, коњугација са шећерним компонентама, као и евентуална полимерна структура, само неки од фактора који се морају узети у обзир при избору услова екстракције (Tura & Robards 2002). Поред тога, фенолна једињења се јављају у различитим деловима биљне ћелије, и то највише у вакуолама и ћелијском зиду (Antolovich et al. 2000). Ово је, поред природе ћелијског матрикса, такође један важан фактор који треба узети у обзир при избору екстракционих услова. Када је избор екстракционог средства у питању, опште је прихваћено да се за екстракцију фенолних једињења веће поларности, као што су фенолне киселине и гликозиди флавоноида, најчешће користе вода, алкохоли и водено-алкохолни растварачи (Tsao & Deng 2004). Због тога су у нашој студији спроведени прелиминарни експерименти како би се изабрао систем растварача за потребе даље оптимизације. Наиме, у овом прелиминарном кораку су упоређивани резултати екстракције фенолних једињења мацерацијом из листа коприве са 50, 75 и 100%-тним метанолом, затим 50, 75 и 96%-тним етанолом и водом. Резултати су показали да су тестирани водено-метанолни екстракти испољили боље екстракционе карактеристике од водено-етанолних екстраката и када је у питању *TP* садржај али и садржај рутина, хлорогенске и 2-*O*-кафеоил малне киселине. Ови резултати су у сагласности са литературним подацима где се метанол спомиње као ефикасније екстракционо средство за екстракцију фенолних једињења од етанола (Tsao & Deng 2004). Тако су водено-метанолни растварачи (50 до 80%-тни метанол) коришћени

за екстракцију хидроксициметне киселине, као и појединих група флавоноида (Tsao & Deng 2004). Такође, метанол се спомиње и као добар инхибитор полифенол оксидазе (Robards 2003; Dai & Mumper 2010), ензима одговорног за разградњу фенолних једињења, што би такође могао да буде један од разлога за виши *TP* принос код водено-метанолних екстраката. У нашој студији, 100%-тни метанолни и 96%-тни етанолни екстракти су имали најмање садржаје укупних и појединачних фенолних једињења. Овај резултат је у складу са резултатима студија које су показале да је за екстракцију фенолних једињења оптимална умерено поларна средина мешавине алкохола и воде (Lapornik et al. 2005; Liyana-Pathirina & Shahidi 2005). Са друге стране, у нашим прелиминарним испитивањима, водени екстракти су имали висок *TP* принос, док је супротно томе, принос појединачних фенолних једињења у овим екстрактима био изузетно низак. Ово би се могло објаснити чињеницом да чиста вода као екстракционо средство, поред фенолних једињења, екстрахује и велику количину баластних материја (угљених хидрата, протеина, органских киселина итд.) које могу да утичу на резултате *TP* садржаја (Chirinos et al. 2007). На основу ових прелиминарних резултата, систем вода-метанол је изабран за даљу оптимизацију процеса екстракције.

Даљи кораци у оптимизацији екстракције спроведени су у циљу постизања максималног *TP* приноса у екстрактима листа коприве. При томе је вршена оптимизација екстракционих фактора (процента метанола у екстракционом средству и трајања екстракције) који омогућавају постизање максималног *TP* приноса. *RSM* методом је одређен 54%-тни метанол као оптимално екстракционо средство и 38 min као оптимално трајање екстракције што је у складу са горепоменутиим закључцима студија које су показале да су екстракциона средства умерене поларности најбоља за екстракцију фенолних једињења (Liyana-Pathirina & Shahidi 2005; Lapornik et al. 2005). Слично, Santos-Buelga и Williamson (2003) су показали да се максималан принос фенолних гликозида управо и постиже екстракцијом са 50%-тним метанолом. Такође, показано је и да екстракти припремљени коришћењем екстракционих средстава код којих је однос органског растварача (метанол, етанол или ацетон) и воде приближно 1:1, дају далеко

виши принос фенолних једињења него екстракти са вишим уделима органских растварача (Turkmen et al. 2006). Један од разлога за овакве екстракционе карактеристике фенолних једињења би могла да буде и чињеница да су ова једињења често гликозилована, па поларност воде присутне у екстракционом средству побољшава њихову екстракцију (Khoddami et al. 2013). Додатни разлог за бољи принос фенолних једињења коришћењем оваквих екстракционих средстава би могло да буде бубрење биљног материјала које изазива вода, што доводи до повећања површине за размену материје између раставарча и биљног материјала, па тиме и повећања приноса фенолних једињења (Tan et al. 2013).

Утицај екстракционих фактора на принос *TP* у нашој студији је био различит за сваки од тестираних фактора. У теорији, продужено време екстракције би требало да доведе до повећања *TP* приноса због другог Фиковог закона дифузије који предвиђа да ће равнотежа екстракције бити постигнута тек након одређеног времена (Silva et al. 2007). Насупрот овоме, у нашој студији трајање екстракције није значајно утицало на *TP* принос. Да трајање екстракције нема значајан утицај на *TP* принос је закључак и студије која се бавила екстракцијом фенолних једињења из јабуке у којој је, као и у нашем испитивању, као екстракционо средство коришћена мешавина воде и метанола (од 70 до 100%-ата метанола) (Alberti et al. 2014). Изостанак значајног утицаја трајања екстракције на *TP* принос би могао да буде последица деградације фенолних једињења са продужењем трајања екстракције, с обзиром да је познато да су она подложна ензимској и неензимској разградњи и оксидацији (Khoddami et al. 2013; Robards 2003). Наиме, разградња фенолних једињења је могла да смањи тј. „прикрије“ утицај трајања екстракције на принос фенолних једињења. Управо ови деградациони процеси су могли да доведу до губитка фенолних једињења и да тиме смање утицај трајања екстракције на *TP* принос. Супротно томе, у нашој студији, проценат метанола у екстракционом средству је показао значајан утицај на *TP* принос. Наиме, максималан *TP* принос постигнут је са 54%-тним метанолом, дакле на самом почетку опсега тестираних удела метанола (50-100% метанол), а са даљим повећањем процента метанола у екстракционом средству, дошло је до опадања *TP*



приноса. На ово јасно указује негативна природа утицаја овог екстракционог фактора. Ова тенденција редукције *TP* приноса са повећањем удела органског растварача у екстракционом средству је и раније примећена. Тако су 50%-тни алкохолни екстракти црног и црног „мате“ чаја имали виши *TP* садржај у односу на 70 и 80%-тне алкохолне екстракте (Turkmen et al. 2006). Такође, при оптимизацији екстракције фенолних једињења из коре врсте *Mangifera pajang*, након постизања максималног приноса са 68%-тним метанолом, при даљем повећању процента метанола у екстракционом средству дошло до је пада *TP* садржаја у екстрактима (Prasad et al. 2011). Разлог оваквих резултата би могла да буде већ поларна природа гликозида фенолних једињења која се боље екстрахују коришћењем екстракционих средстава са вишим садржајем воде, као и поменуто повећање контактне површине између раставарача и биљног материјала као последице бубрења изазваног водом (Khoddami et al. 2013; Tan et al. 2013).

Постоје два механизма преко којих ултразвук побољшава ефикасност екстракције и то су повећање *TP* приноса и скраћење трајања екстракције (Shirsath et al. 2012; Vilku et al. 2008). Тако је и у нашој студији примена ултразвука побољшала ефикасност екстракције па су екстракти припремљени применом ултразвука имали веће *TP* садржаје, садржаје укупних флавоноида, као и садржаје хлорогенске и 2-*O*-кафеоил малне киселине у поређењу са одговарајућим екстрактима припремљеним мацерацијом. Бољи приноси укупних и одређених појединачних фенолних једињења при примени ултразвучне екстракције су вероватно последице кавитације, али и термичких ефеката који се јављају услед примене ултразвука (Shirsath et al. 2012). Поменути ефекти могу да доведу до ефикаснијег разарања ћелијског зида, додатног уситњавања биљног материјала и бољег мешања, па самим тим, и интензивирања процеса размене материје између биљног материјала и екстракционог средства (Soria & Villamiel 2010; Shirsath et al. 2012). Међутим, у нашој студији ултразвук је имао негативан ефекат на принос рутина што би пре могло да буде последица његове интеракције са слободним радикалима насталим због кавитације (Soria & Villamiel 2010), него смањене растворљивости овог флавоноида услед примене ултразвука. Наиме, примена ултразвука у воденој средини има за последицу

формирање хидроксилних радикала (Paniwnyk et al. 2001), а с обзиром да је показано да рутин има изузетну способност неутрализације хидроксилног радикала (Husain et al. 1987), очекивано је да је управо ово, бар делимично, допринело смањењу приноса рутина код ултразвучне екстракције. С друге стране, побољшани антиоксидативни капацитети екстраката припреманих применом ултразвука се могу приписати повећаном садржају како хлорогенске и 2-О-кафеоил малне киселине, тако и повишеном *TP* садржају ових екстраката. Поред тога, познато је и да антиоксидативна активност флавоноида зависи директно од степена њихове хидроксилације (Wanasundara et al. 1997), а показано је и да се применом ултразвука постиже већи степен хидроксилације ових антиоксиданаса, што би такође могло да буде узрок повећаног антиоксидативног капацитета ових екстраката (Ashokkumar et al. 2008). Наша истраживања су показала да код ултразвучних екстракција, трајање екстракције има утицаја на *TP* принос јер је екстракт припремљен применом ултразвука у трајању од 38 min имао значајно виши *TP* принос него екстракти припремљени коришћењем ултразвука са краћим трајањима екстракције. Овај резултат не изненађује, с обзиром да примена ултразвука интензивира размену материје између биљног материјала и екстракционог средства (Esclapez et al. 2011), па је вероватно зато и уочљивија разлика у *TP* приносу између екстраката различитих трајања екстракције. Ово објашњење је у складу и са чињеницом да је трајање екстракције код екстраката припремљених применом ултразвука такође утицало и на садржај укупних флавоноида. Повећање *TP* приноса и приноса укупних флавоноида са повећавањем трајања екстракције је вероватно узроковало бољи антиоксидативни капацитет (одређиван *TEAC* и *FRAP* методама) екстракта припремљеног применом ултразвука у трајању 38 min у поређењу са осталим екстрактима добијеним такође применом ултразвука, али са краћим трајањима екстракција.

Боља антиоксидативна својства *UE* у поређењу са *BHT* се могу објаснити чињеницом да је *UE* смеша различитих фенолних једињења која су позната по својој антиоксидативној улози, па је већа вероватноћа да ће неко од тих једињења бити подложније оксидацији по реакционом механизму коришћене антиоксидативне методе или чија молекулска

---

структура неће бити узрок стерних сметњи за одвијање реакције (Craft et al. 2012). При поређењу са витамином Ц, *UE* има вишеструко слабију способност неутралисања супероксидног радикала. С обзиром да су бројне студије показале да је способност разних лековитих биљака да неутралишу супероксидне радикале блиска способности витамина Ц (Kumaran & Joel Karunakaran 2007; Ningappa et al. 2008), можемо да закључимо да је *UE* показао слабу способност неутралисања супероксидног радикала. Поред тога, и антиоксидативна активност *UE*, мерена *FRAP* и *TEAC* методама, је била доста нижа од антиоксидативне активности витамина Ц.

Фентонова реакција се у *in vivo* условима сматра главним извором хидроксилних радикала (Carocho & Ferreira 2013; Kohen & Nyska 2002) за које је познато да доводе до оштећења биолошких молекула узрокујући тако оксидативни стрес (Ayala et al. 2014). За ову реакцију је кључно присуство јона метала (Kohen & Nyska 2002), па би се могло закључити да је способност хелирања јона метала показатељ индиректне антиоксидативне способности неког екстракта. У овом истраживању, *UE* је показао високу релативну способност хелирања јона гвожђа (у поређењу са *EDTA*). Наиме, опсежни преглед литературе је показао да је у случају великог броја биљака, способност хелирања јона гвожђа од 13 до 126 пута слабија од *EDTA* (Bourgou et al. 2008; Ebrahimzadeh et al. 2008; Liu et al. 2008). Ова чињеница указује на то да је *UE* моћан хелирајући агенс за јоне гвожђа и да би, потенцијално, у *in vivo* условима могао да смањи настанак оксидативних оштећења изазваних Фентоновом реакцијом. Оваква способност хелирања би се могла објаснити присуством рутина, најзаступљенијег флавоноида у *UE*, који се раније показао као јако добар хелирајући агенс (Aherne & O'Brien 2000). Поред тога, сама биљка коприве садржи и значајну количину протеина (23-24%) (Upton 2013), који су такође познати као добри хелирајући агенси јона метала (Ueda et al. 2003). Свакако, и присуство хлорогенске киселине, за коју је показано да има изражену способност хелирања јона гвожђа (Kono et al. 1998), би такође могло да буде узрок високе хелирајуће моћи коју је *UE* испољио.

У овој студији је по први пут показано антихипертензивно дејство, стимулативни ефекти на активност ензима антиоксидативне заштите, повећање антиоксидативног капацитета плазме, побољшање липидног статуса, као и повећање експресије *eNOS* и смањење експресије *nNOS* ензима у бубрегу као последице хроничног третмана екстрактом листа коприве у експерименталном моделу есенцијалне хипертензије.

Антихипертензивни ефекат *UE* није изненађујући с обзиром на чињеницу да су поједине студије и раније показале вазорелаксирајуће и акутне хипотензивне ефекте екстракта коприве (Ziyat et al. 1997; Dizaye et al. 2013; Qayyum et al. 2016; Tahri et al. 2000). Тако су *Testai* и сар. (2002) показали вазорелаксирајући и хипотензивни ефекат интравенске администрације екстракта корена коприве код нормотензивних пацова. Аутори поменуте студије су такође показали да овај екстракт стимулише ослобађање NO-а у ендотелу крвних судова, чему су приписали хипотензивни ефекат екстракта. Такође, интравенска перфузија нормотензивних пацова воденим екстрактом коприве у дозама од 4 и 24 mg/kg/h воденог екстракта коприве је довела до пада крвног притиска и минутног волумена срца, али и повећања диурезе и натриурезе (Tahri et al. 2000). У нашој студији је као ефекат третмана са *UE*, поред поменутих антихипертензивних ефеката, дошло и до повећања садржаја укупних нитрата и нитрита у плазми и урину. До скоро се за нитрате и нитрите пореклом из хране сматрало да су производи ланца исхране са потенцијално штетним ефектима на људско здравље (Lundberg et al. 2008). Међутим, последњих година је у бројним студијама показано да се ови јони физиолошки "рециклирају" у крви и ткивима и да се при томе формира NO, тако да је у научној заједници све прихваћенији став да они представљају егзогени извор NO-а (Hord et al. 2009; Lundberg et al. 2008). Познато је да биљке апсорбују азот из земљишта у облику катјона (амонијумових соли) или анјона (нитрата) (Rose & Jacot Guillardmod 1974) и да представљају изворе нитрата и нитрита у људској исхрани (Hord et al. 2009). Метаболизам егзогених нитрата и нитрита у организму је сложен и укључује редукцију нитрата до нитрита од стране микробиоте из плувачке (Lundberg et al. 2008), као и цревне микрофлоре (Jensen 2009), али и превођење нитрита у азотасту киселину у желуцу и њено

разлагање на NO и друге оксиде азота у присуству витамина Ц и/или полифенолних једињења (Lundberg et al. 2008). У сваком случају, један део ових јона се апсорбује у непромењеном облику у дигестивном тракту (Lundberg et al. 2008) што би могао да буде разлог повишеног садржаја нитрата и нитрита у плазми и урину експерименталних животиња које су примале веће UE дозе. У прилог овоме говори и чињеница да је показано да UE садржи одређену количину нитрита, као и да биљке из рода *Urtica* имају изражен афинитет ка апсорпцији нитрата из земљишта (Rose & Jacot Guillarmod 1974). Механизам којим долази до синтезе NO-а из нитрита у циркулацији је првенствено везан за редукцију ових јона у хипоксичним условима у присуству деоксихемоглобина при преласку крви из артеријске у венску циркулацију (Cosby et al. 2003; Lundberg et al. 2008). Управо у оваквим условима, деоксихемоглобин има функцију нитрит редуктазе и на овај начин, посредно, доводи до вазорелаксације (Cosby et al. 2003). Ово би могло да буде објашњење за антихипертензивне ефекте UE третмана без смањења укупног периферног васкуларног отпора. Наиме, управо је синтезе NO-а из нитрита у присуству деоксихемоглобина (преовлађујућа форма хемоглобина у венској циркулацији) могла да доведе до венске дилатације, и смањења прилива крви у срце (Mason et al. 1971). Да је венска дилатација одговорна за пад притиска услед UE третмана указује и чињеница да је до пада крвног притиска дошло уз смањење минутног волумена срца, а да није било промене протока и отпора у појединачним артеријама, као ни промене укупног периферног васкуларног отпора. У прилог овоме говоре и студије које су показале да нитро једињења, али и разна органска једињења која имају нитро групу (нпр. нитроглицерин), унета орално или сублингвално, доводе у већој мери до венске него до артеријске дилатације, што резултује благим падом артеријског притиска и падом централног венског притиска, падом венског прилива, па тиме и минутног волумена срца (Mason et al. 1971). Поред тога, показано је и да високе концентрације нитрита остварују негативан инотропски ефекат преко eNOS независне синтезе NO-а и активације cGMP-PKG пута који је одговоран за релаксацију леве срчане коморе (Pellegrino et al. 2009; Cerra et al. 2009). Поред тога, паду притиска и минутног волумена срца у нашој студији је могао

---

да допринесе и кверцетин, агликон рутина (најзаступљенијег флавоноида у *UE*) који се јавља као његов метаболит у циркулацији (Erlund et al. 2000). Наиме, за кверцетин је показано да има антагонистичко дејство према  $\text{Ca}^{2+}$ -каналима у кардиомиоцитима (Nishida & Satoh 2009; Satoh 2004), а с обзиром да ова блокада доводи до смањења контрактилности миокарда (Hensley et al. 1997), ово је могло да доведе до пада минутног волумена срца па, последично, и пада притиска. У прилог калцијум-блокаторском и негативном инотропском ефекту *UE* третмана говоре и резултати студије где је показано да екстракт корена коприве остварује хипотензивни ефекат, између осталог, и тако што доводи до негативног инотропског ефекта (Testai et al. 2002). Поред тога, *Qaуuит* и сар. (2016) значајну улогу у антихипертензивном и хипотензивном одговору на третман екстрактом ризома коприве у *in vitro* условима и у условима акутне интравенске апликације код пацова приписују управо блокади  $\text{Ca}^{2+}$  канала.

Реактивне врсте кисеоника представљају свеприсутне деривате молекуларног кисеоника ( $\text{O}_2$ ) који имају значајну улогу у ћелијској сигнализацији, али чије претерано формирање може да доведе до ћелијских оштећења (Тоууз & Schiffrin 2004). С друге стране, постоје ендогени и егзогени антиоксиданси који обезбеђују детоксикацију у случају превелике продукције реактивних врста кисеоника у ћелији (Lee et al. 2003). Једну групу ендогених антиоксиданаса чија је улога неутралисање реактивних врста кисеоника представљају и ензими антиоксидативне заштите (*SOD*, *CAT*, *GSH-Px* и *GR*) (Lee et al. 2003). Однос између формирања реактивних врста кисеоника и њиховог неутралисања од стране ових ензима је такав да било какав дисбаланс у овим процесима може да има за последицу оштећења ткива (Uttara et al. 2009). Један од основних системских маркера овог дисбаланса, који представља оксидативни стрес, је степен липидне пероксидације (Ho et al. 2013). Поред тога, у контексту оксидативног стреса, важно је напоменути да антиоксидативни капацитет плазме представља мерило неензимског антиоксидативног капацитета који је, добрим делом, и егзогеног карактера (Kampa et al. 2002).

Иако је општеприхваћен став да је продукција реактивних врста кисеоника повишена код хипертензивних субјеката (Yang et al. 2007), бројне студије указују на разлике у

активности ензима антиоксидативне заштите у есенцијалној хипертензији у поређењу са нормотензијом, како код људи тако и код експерименталних животиња. Тако су неке студије показале да је активност ових ензима у еритроцитима хипертензивних пацијената повишена у односу на активност код нормотензивних пацијената, што аутори објашњавају компензаторним механизмом, тј. одбрамбеним одговором организма на повишену продукцију реактивних врста кисеоника која је карактеристична за хипертензију (Yang et al. 2007; Yuan et al. 1996). Такође, поједине студије указују на снижену активност ензима антиоксидативне заштите код хипертензивних пацијената (Montezano & Touyz 2012). Резултати наше раније студије показали су, са једне стране, да се *SOD* и *CAT* активности у еритроцитима *SHR* не разликују значајно у односу на активности ових ензима код нормотензивних пацова (Mihailovic-Stanojevic et al. 2016), док је са друге стране, активност *GSH-Px* код *SHR* била значајно смањена, што је допринело повећању њихове осетљивости на системски оксидативни стрес индукаван водоник пероксидом. Резултати ове дисертације су показали да третман са *UE*, без обзира на примењену дозу, доводи до повећања активности *SOD* и *CAT* у еритроцитима *SHR* и до повећања антиоксидативног капацитета плазме (неензимске компоненте укупног антиоксидативног потенцијала), што доприноси значајном смањењу индекса липидне пероксидације плазме, тј. смањењу системског оксидативног стреса. Непромењене активности *GSH-Px* и *GR* након третмана са *UE* указују на то да у неутралисању реактивних врста кисеоника од стране ензима антиоксидативне заштите у случају третмана са *UE* не учествује глутатионски ензимски систем, тј. да је за неутрализацију водоник пероксида у нашој студији одговорна *CAT*. Резултат који иде у прилог овом закључку је и изостанак промене активности *GR* која редукује оксидовани глутатион настао активношћу *GSH-Px*. Чињеница да је третман са *UE* довео до повећања активности *SOD* и *CAT* у еритроцитима без повећања њихове концентрације, указује на то да до повећања активности није дошло као последица повећања њихове *de novo* синтезе. Показано је у ранијим студијама да егзогени нитрити могу да доведу до повећања *SOD* активности у еритроцитима (Montenegro et al. 2012), а с обзиром да смо показали да је *UE*

богат извор нитрита, ово би такође могло да буде узрок повећане активности овог ензима код *UE* третираних група. Поред тога, повећање активности ензима антиоксидативне заштите се у литератури често приписује и рутину и кверцетину. Тако је у студији која је проучавала ефекте кверцетина на ензиме антиоксидативне заштите, показано да кверцетин делује стимулативно на активност *SOD*, *CAT*, *GR* и *GSH-Px* у хипоталамусу и фронталном кортексу пацова са окулзијом средње церебралне артерије (Ahmad et al. 2011). Такође, рутин и кверцетин су стимулативно деловали на активност *SOD* и *CAT* у миокарду у моделу инфаркта миокарда изазваног исхемијом и реперфузијом код контролних и дијабетичних пацова (Annappurna et al. 2009). Испољавање ефеката ових једињења је олакшано њиховом неполарном природом због које могу лако да продру кроз неполарне ћелијске мембране директно у ћелије где и остварују поменута дејства (Annappurna et al. 2009). Међутим, механизам стимулације активности ензима антиоксидативне заштите од стране рутина и кверцетина још увек није у потпуности разјашњен. У нашој студији није дошло до промене активности *SOD*, *CAT* и *GSH-Px* у групи *SHR* третираној лосартаном. Ово не изненађује с обзиром да је наша претходна студија такође показала да четворонедељни третман лосартаном у дози од 10 mg/kg на дан не утиче на *SOD* активност (Miloradovic et al. 2007). С обзиром да није дошло до промене активности *SOD*, очекивано је и да активности *CAT* и *GSH-Px* остану непромењене с обзиром да ова два ензима катализују разлагање водоник пероксида (Zhan et al. 2004), нуспроизвода дисмутације супероксидног радикала од стране *SOD* ензима (Matés 2000). С друге стране, терапија лосартаном је у нашој студији довела до повећања *GR* активности. Да лосартан има способност утицаја на глутатионски систем показала је и студија у којој је деветонедељна терапија лосартаном довела до драстичног повећања концентрације глутатиона у плазми хипертензивних пацијената у односу на вредности пре терапије (Onmez et al. 2002). Штавише, ове вредности су након терапије биле на нивоу оних уочених у групи нормотензивних пацијената. С обзиром да је у условима есенцијалне хипертензије показано да је концентрација глутатиона у плазми снижена (Onmez et al. 2002), овакав ефекат се сматра повољним. Такође, у условима блокаде *AT<sub>1</sub>*



рецептора (лосартаном или неким другим  $AT_1$  антагонистом) повећава се ниво циркулишућег ангиотензина II чиме је и његово везивање за  $AT_2$  рецепторе повећано, што има за последицу покретање сигналне каскаде одговорне за активацију глутатионског антиоксидативног система (Onmez et al. 2002).

До липидне пероксидације и нагомилавања *TBARS*-а, биомаркера оксидативног стреса, долази у процесу неензимске пероксидације незасићених масних киселина ћелијских мембрана и мембрана органела у условима повишеног формирања реактивних врста кисеоника и/или изостанка адекватног антиоксидативног одговора ћелије (Benzie 1996). Познато је да је за иницијацију овог процеса кључно присуство хидроксилног радикала (Gutteridge 1995) за чије је формирање у Фентоновој реакцији кључан предуслов постојање редукованих јона прелазних метала (пре свега јона гвожђа и бакра) (Benzie 1996). С друге стране, Хабер-Вајсова реакција, у којој учествују супероксидни радикал и водоник пероксид, извор је редукованих јона метала (Benzie 1996). С обзиром да су као последица третмана са *UE* повећане активности *SOD* и *CAT*, чије су основне функције неутралисање супероксидног радикала и водоник пероксида, можемо да претпоставимо да је управо повећана активност поменутих ензима, бар делимично, одговорна за смањену липидну пероксидацију у плазми. Поред тога, смањен оксидативни стрес услед третмана са две ниже *UE* дозе се, поред директне везе са повећаном активношћу ензима антиоксидативне заштите, може посматрати и у контексту повећаног неензимског антиоксидативног капацитета плазме. Као што је већ поменуто, повећан антиоксидативни капацитет плазме као последица *UE* третмана, би такође могао да буде разлог смањења липидне пероксидације плазме и то преко директне неутрализације реактивних врста кисеоника, па, између осталог, и супероксидног радикала, хидроксилног радикала и водоник пероксида. Ово повећање антиоксидативног капацитета плазме је вероватно резултат присуства метаболита различитих једињења пореклом из *UE* у плазми, и то првенствено метаболита фенолних једињења (Devaraj et al. 2002). И друге студије које су се бавиле ефектима различитих екстраката коприве на оксидативни статус, смањење липидне пероксидације приписују фенолним једињењима

присутним у овим екстрактима (Özkol et al. 2012; Cetinus et al. 2005). Тако су Özkol и сар. (2012) закључили да су управо флавоноиди из екстракта извршили неутрализацију слободних радикала и, последично, довели до смањења липидне пероксидације у њиховом експерименталном моделу. Сличан је закључак и Cetinus и сар. (2005) који фенолним једињењима из екстракта коприве приписују директну *in vivo* антиоксидативну активност и смањење липидне пероксидације. Од фенолних једињења детектованих у *UE* која би могла да се сматрају одговорним за директну антиоксидативну активност, у литератури се спомињу рутин и кверцетин. Рутин је показао антиоксидативно дејство тако што је довео до смањења липидне пероксидације плазме код дијабетичних пацова (Kamalakkannan & Prince Mainzen Stanely 2006), док је кверцетин показао заштитну улогу у условима повишеног оксидативног стреса у моделу церебралне исхемије код пацова управо смањујући липидну пероксидацију (Ahmad et al. 2011). Поред рутина, и хлорогенска киселина је у појединим студијама показала повољан утицај на липидну пероксидацију у ткивима. Тако је у моделу оксидативног стреса изазваног са  $CCl_4$  и зрачењем, показано да хлорогенска киселина доводи до смањења липидне пероксидације у серуму и јетри пацова (Zhou et al. 1993). Снижење липидне пероксидације након примене хлорогенске киселине показано је и у студији која се бавила неуропротективним ефектима овог једињења у моделу скополамин-индуковане амнезије код мишева (Kwon et al. 2010). У овој студији је примена јако ниских доза хлорогенске киселине (3, 6 и 9 mg/kg на дан) довела до пада липидне пероксидације у хипоталамусу и фронталном кортексу мишева. Механизам дејства хлорогенске киселине на липидну пероксидацију у овој студији није расветљен, али аутори ове ефекте приписују директном антиоксидативном дејству хлорогенске киселине (Kwon et al. 2010). Поред тога, могуће је и да је хелација јона метала од стране метаболита *UE* екстракта присутних у плазми експерименталних животиња такође допринела смањењу липидне пероксидације. Изражена способност хелирања јона метала раније је показана како за *UE* тако и за њене поједине компоненте (рутин и хлорогенска киселина) (Kono et al. 1998; Aherne & O'Brien 2000), тако да и овај ефекат делом доприноси смањењу липидне

пероксидације. У прилог овоме говоре и резултати студија које су показеле да су рутин, хлорогенска и кафеина киселина, поред тога што се у дигестивном тракту преводе у бројне метаболите (Crozier et al. 2010), у системској циркулацији присутни и у непромењеном облику (Karakaya 2004; Olthof et al. 2001). Међутим, за разлику од нижих *UE* доза, третман са *UE* у дози од 200 mg/kg на дан је довео до повећања концентрације маркера липидне пероксидације у урину, највероватније филтрацијом продуката оксидативног стреса из бубрега у урин, узимајући у обзир да бројна фенолна једињења, укључујући деривате бензојеве и циметне киселине (кафеина киселина, протокатехуинска киселина, *p*-кумаринска киселина и ванилинска киселина), могу деловати прооксидативно зависно од њихове концентрације и тако изазвати пероксидацију липида (Eghbaliferiz 2016). У прилог томе иде и чињеница да је степен липидне пероксидације у еритроцитима *SHR* који су примали највишу *UE* дозу био повећан. Наиме, бројне студије су показале да фенолна једињења када се дају у високим дозама делују као про-оксиданси (Bouayed & Bohn 2010a). Тако су *De Marchi* и сар. (2009) показали да кверцетин у ниским концентрацијама остварује антиоксидативно дејство, док у концентрацијама преко 50  $\mu$ M делује прооксидативно директно или посредно, генеришући супероксидне радикале. Поред тога, кверцетин и рутин лако пенетрирају ћелијске мембране (Annappurna et al. 2009) где, присутни у високим концентрацијама, могу да остваре прооксидативно дејство и повећају степен пероксидације липидних мембрана еритроцита. Показано је и да изузетно високе дозе кверцетина, због прооксидативног дејства, доводе до смањења броја тиолних веза које су, поред витамина Ц, важне за регенерисање витамина Е, кључног антиоксиданса липидних мембрана (Robaszkiewicz et al. 2007; Bouayed & Bohn 2010b). Овим би се могао објаснити повишен оксидативни стрес у мембранама еритроцита без повећања овог параметра у плазми животиња у случају највише *UE* дозе. Евидентно је да у случају ове дозе, повишен антиоксидативни капацитет плазме, као и повећане активности *SOD* и *CAT* у еритроцитима нису били довољни да спрече оксидативни стрес у еритроцитним мембранама.

Холестерол представља важан структурни елемент биолошких мембрана, док његов

остатак циркулише у крви или служи ако прекурсор синтезе жучних киселина, стероидних хормона и витамина Д (Fki et al. 2005). Међутим, бројне епидемиолошке студије су показале да повишен садржај холестерола представља основу за развој атеросклерозе (Zanotti et al. 2015). Ово је од значаја када се узме у обзир да је хипертензија један од главних фактора ризика за настанак атеросклерозе и осталих кардиоваскуларних болести (Mancia et al. 2013). Иако код одраслих *SHR* који су били предмет ове студије, липидни статус није поремећен у односу на исти код нормотензивних животиња (необјављени резултати), узимајући у обзир горе наведене факторе ризика, повишен ниво *HDL* холестерола у плазми након четворонедељног *UE* третмана се може сматрати благотворним, с обзиром да су бројне студије показале негативну корелацију између концентрације *HDL* холестерола у плазми и кардиоваскуларних компликација (Zanotti et al. 2015). Поред тога, смањење односа укупни холестерол/*HDL* и *LDL/HDL*, који представљају биомаркере липидног статуса, такође указује на повољне ефекте *UE* третмана. Резултати бројних студија су показали да фенолна једињења могу да остваре позитиван утицај на липидни статус (Baba et al. 2007; Stanely & Kannan 2006; Fki et al. 2005; Zanotti et al. 2015). Тако се побољшање липидног статуса (смањење укупног и *LDL* и повећање *HDL* холестерола) у плазми, као последица конзумирања производа биљног порекла, приписује фенолним једињењима присутним у њима (Baba et al. 2007; Fki et al. 2005). Од фенолних једињења детектованих у *UE*, раније је показано да рутин доводи до повећања концентрације *HDL* холестерола у плазми (Stanely & Kannan 2006). Механизам овог дејства би могао да се одвија преко метаболита рутина у плазми (кверцетина и кверцетин 3-*O*-глукуронида) (Jaganath et al. 2006; Morand et al. 2000; Erlund et al. 2000) за које је раније показано да имају стимулативно дејство на повећање експресије појединих рецептора и транспортера укључених у синтезу *HDL* холестерола (Lee, Moon, Cho, Chung, & Shin, 2013; Ohara et al., 2013). Поред тога, студије су показале да и хлорогенска киселина утиче на метаболизам липида (Meng et al. 2013; Wan et al. 2013). Тако је показано да хлорогенска киселина доводи до општег побољшања липидног статуса смањењем укупног холестерола и *LDL*, као и повећањем *HDL* холестерола код

хиперхолесеролемичних пацова (Wan et al. 2013). Поред тога, у наведеној студији хлорогенска киселина се сматра одговорном и за повећање експресије *mRNK PPAR- $\alpha$* , важног рецептора за метаболизам липида, указујући на механизам преко ког она остварује дејство. Узимајући све претходно у обзир, можемо да закључимо да су фенолна једињења из *UE* бар делимично допринела повећању *HDL* холестерола и тиме последично, побољшању липидног статуса у плазми пацова у овој студији. Ипак, важно је истаћи да се у погледу анализе нивоа триглицерида у плазми, хронична примена дозе *UE* од 200 mg/kg на дан показала неадекватном у односу на остале третмане, узимајући у обзир чињеницу да повишени триглицериди представљају засебан фактор ризика за кардиоваскуларне болести у општој популацији независно од нивоа *HDL* холестерола (Hokanson 1996).

У нашој студији је у бубрегу експерименталних животиња услед третамена са две више *UE* дозе дошло до дозно-зависног повећања експресије *eNOS* ензима, затим смањења експресије *nNOS* ензима у свим третираним групама, док је експресија *iNOS* ензима остала непромењена. Ово не изненађује с обзиром да су бројне студије показале да у *in vitro* и *in vivo* условима бројни биљни екстракти и производи, али и фенолна једињења, могу да врше модулацију експресије, синтезе и активности ензима из *NOS* фамилије. Тако су неке студије показале да инкубација ендотелних ћелија са вином повећава *eNOS* експресију. Наиме у једној студији, при инкубацији ендотелних ћелија са вином, дошло је до повећања експресије *mRNK eNOS* ензима као и његове синтезе, а аутори сматрају да су фенолна једињења из вина довела до ових ефеката (Wallerath et al. 2003). Да су феноли одговорни за повећање нивоа *eNOS* ензима показала је и студија Leikert и сар. (2002) у којој је третман ендотелних ћелија екстрактом фенолних једињења пореклом из вина довео до двоструког повећања експресије протеина *eNOS* ензима. Слично, Li и сар. (2004) су показали да дуготрајна инкубација хуманих васкуларних ендотелних ћелија са екстрактом листа артичоке повећава промоторску активност *eNOS* ензима, затим *eNOS mRNK* експресију, као и синтезу *eNOS* ензима. И ова група аутора ове ефекте приписује фенолним једињењима, конкретно флавоноидима присутним у екстракту. Када су у

питању појединачна фенолна једињења, показано је да рутин доводи до стимулације експресије *eNOS* ензима у *HUVEC* ћелијама (енгл. *human umbilical vein endothelial cells*) (Ugusman et al. 2014). Механизми ових ефеката су углавном нерасветљени, али су *Ugusman* и сар. (2014) показали да рутин стимулише синтезу *eNOS* ензима преко повећања експресије фактора раста *bFGF* (енгл. *basic fibroblast growth factor*). Поред тога, *Abd-Elbaset* и сар. (2015) су показали да и кверцетин врши модулацију експресије *NOS* ензима тако што повећава експресију *eNOS*, а снижава експресију *iNOS* ензима у јетри пацова која је оштећена исхемијом и реперфузијом. Слично, *Vicente-Sánchez* и сар. (2008) показали да је кверцетин у стању да повећа *eNOS* експресију у јетри у моделу хепатотоксичности изазване кадмијумом код пацова. Ензим *nNOS* је у бубрегу преодоминантно локализован у ћелијама *macula densa*, неуронима, Бомвановој капсули, сабирним каналићима, где учествује у контроли и регулацији гломеруларне хемодинамике, лучењу ренина и екскрецији натријума (Sullivan et al. 2010). У ћелијама *macula densa* основна улога му је контрола тонуса аферентне артериоле као одговора на ангиотензин II индуковано смањење гломерулске филтрације (Ren et al. 2001; Pereira et al. 2009). Експресија *nNOS* ензима код *SHR* пацова је значајно повећана у поређењу са његовим садржајем код *Wistar-Kyoto* соја (Тојо et al. 2006), а његова прекомерна експресија је посредована ангиотензином II, тј. активацијом сигналних путева везаних за *AT<sub>1</sub>* рецептор (Pereira et al. 2009), што су аутори потврдили применом лосартана у дози од 10 mg/kg т.м. током 28 дана. У нашој студији је дошло до смањења експресије *nNOS* ензима, како у групи третираној лосартаном, тако и у свим *UE* третираним групама. У нашој студији, као и у горе поменутој, блокада *AT<sub>1</sub>* рецептора лосартаном је највероватније одговорна за смањења експресије *nNOS* ензима у бубрезима *SHR* пацова. С друге стране, поред доказа да бројна фенолна једињења и биљни екстракти могу да врше модулацију експресије *nNOS* ензима (Appeldoorn et al. 2009; Choi et al. 2002; Sutherland et al. 2004), потребно је напоменути и да повећање оксидативног стреса такође може да доведе до повећања експресије овог ензима у бубрегу (Pereira et al. 2009). Стога би се смањење експресије *nNOS* ензима у бубрезима *SHR* пацова третираних са *UE* могло

---

приписати снажним антиоксидативним ефектима екстракта. Резултати студије Ye и сар. (2002) су показали да интравенална инјекција раствора фенолних једињења доводи до активације симпатичког нервног система. С обзиром да је познато да *nNOS* врши инхибицију симпатичке активности (Wang & Gollidge 2013), могуће је да је код виших *UE* доза компензаторним механизмом, као последицом присуства већег садржаја фенолних једињења у овим екстрактима, дошло до повећања експресија *nNOS*, како у односу на групу третирану лосартаном, тако у поређењу са групом *SHR* пацова која је примала 10 mg/kg на дан *UE*.

---

## 6. Закључци

На основу резултата изнетих у овој дисертацији може се закључити да су водено-метанолни растварачи боља екстракциона средства од водених и водено-етанолних када су у питању садржај укупних фенола, али и појединачних фенолних једињења. Такође, ултразвучна екстракција се показала бољом екстракционом техником од мацерације јер су са њом постигнути виши садржаји укупних фенола и флавоноида, као и већине фенолних једињења у екстрактима. Коначно, закључено је да су за максималан принос фенолних једињења оптимални следећи услови: 54%-тни метанол, трајање екстракције од 38 минута, а ултразвучна екстракција се показала као ефикаснија екстракциона метода од мацерације. Показано је и да овако добијени екстракт има високу антиоксидативну активност. Поред тога, резултати *in vivo* студије су показали да третман екстрактом листа коприве доводи до снижења крвног притиска и минутног волумена срца. Такође, овај третман је поправио оксидативни статус експерименталних животиња тако што је довео до повећања активности појединих ензима антиоксидативне заштите, повећања антиоксидативног капацитета плазме, као и снижења липидне пероксидације плазме. Поред тога, третман је довео и до повећања садржаја нитрата и нитрита у телесним течностима експерименталних животиња (плазми и урину), као и до побољшања липидног статуса. И на крају, овај третман екстрактом коприве стимулисао је експресију *eNOS*, а смањио експресију *iNOS* ензима у бубрегу експерименталних животиња.

Конкретније:

- Фенолна једињења која су најзаступљенија у листу коприве су рутин, хлорогенска и 2-О-кафеоил мална киселина. Поред тога, присутни су, у доста нижим концентрацијама и *p*-кумароил малат, кафена киселина, изокверце-



---

тин, кемферол-3-О-рутинозид, изорамнетин-3-О-рутинозид и изораметин хексозид.

- Водено-метанолни растварач је показао знатно боље екстракционе карактеристике од водено-етанолног, као и чисте воде када је у питању садржај укупних фенола, али и појединачних фенолних једињења.
- Ултразвучна екстракција се показала ефикаснијом од мацерације када је у питању садржај укупних фенолних једињења и флавоноида, хлорогенске и кафеине киселине, али не и рутина. Поред тога, екстракти припремљени овом екстракционом техником су имали боље антиоксидативне капацитете.
- Највиши принос екстракције укупних фенолних једињења из листа коприве се постиже коришћењем 54%-тног метанола и ултразвучном екстракцијом у трајању од 38 минута.
- Садржај метанола у екстракционом средству је значајно утицао на принос фенолних једињења у екстрактима, док трајање екстракције није показало значајан утицај на овај садржај.
- Суви екстракт листа коприве (*UE*) припремљен екстракцијом коришћењем оптималних екстракционих параметара (54% метанол, трајање екстракције 38 min и примена ултразвучне екстракције) је показао висок антиоксидативни капацитет у поређењу са *BHT*, али лошији у поређењу са витамином Ц. Такође, овај екстракт је показао изузетан афинитет ка хелирању јона гвожђа.
- Четворонедељни третман са све три *UE* дозе је довео до снижења систолног и дијастолног крвног притиска, док је третман са 50 и 200 mg/kg *UE* на дан довео и до снижења средњег артеријског притиска експерименталних животиња. Поред тога, услед третмана је дошло и до смањења минутног волумена срца и благог снижења ударног волумена срца, без промена у

---

укупном периферном отпору, срчаној фреквенци и протоцима и отпорима кроз аорту, каротидну и реналну артерију.

- Четворонедељни третман са *UE* је довео до повећања садржаја метаболита азотног монооксида ( $NO_x$  и  $NO_2$ ) у плазми и урину експерименталних животиња.
- Све три *UE* дозе су довеле до повећања активности *SOD* и *CAT* у еритроцитима, као и повећања антиоксидативног капацитета плазме. Поред тога, *UE* третман је довео и до снижења оксидативног стреса у плазми експерименталних животиња.
- И поред тога што је довео до повећања активности ензима антиоксидативне заштите у еритроцитима, антиоксидативног капацитета плазме и смањења системског оксидативног стреса, четворонедељни третман са највишом *UE* дозом је резултовао повећањем оксидативног стреса у еритроцитима и урину као и снижењем експресије *GSH-Px* у еритроцитима експерименталних животиња.
- Четворонедељни третман са све три *UE* дозе је довео до побољшања липидног статуса експерименталних животиња повећањем *HDL* холестерола и смањењем индекса атеросклерозе, док је доза од 200 mg/kg на дан ипак остварила и неповољан утицај на липидни статус тако што је довела до повећања триглицерида у плазми експерименталних животиња у поређењу са осталим третманима.
- У ткиву бубрега је услед третмана са две више *UE* дозе (50 и 200 mg/kg на дан) дошло до повећања експресије *eNOS* ензима, док је третман са све три дозе довео до смањења експресије *nNOS* ензима у бубрегу експерименталних животиња.

Резултати ове дисертације дају увид научној јавности, али и индустријском сектору, о доминантним фенолним једињењима и оптималним условима за екстракцију

---

истих из листа коприве, биљке која је богата биолошки активним једињењима, а са друге стране незахавна и повољна за узгој. Такође, резултати показују да хроничан третман екстрактом листа коприве може да има позитивне кардиоваскуларне ефекте, да доведе до побољшања оксидативног статуса, као и липидног статуса код хипертензивних субјеката. Поред тога, показано је и да хроничан третман екстрактом листа коприве може и да утиче на експресију *NOS* ензима кључних за хомеостазу васкулатуре.

---

## Литература

- Abd-Elbaset, M. et al., 2015. Quercetin modulates iNOS, eNOS and NOSTRIN expressions and attenuates oxidative stress in warm hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 4, pp.246–255.
- Acosta-Estrada, B.A., Gutiérrez-Urbe, J.A. & Serna-Saldívar, S.O., 2014. Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152, pp.46–55. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.093>.
- Aherne, S.A. & O'Brien, N.M., 2000. Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin and rutin, against tert-butylhydroperoxide and menadione-induced DNA single strand breaks in Caco-2 cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(6), pp.507–514.
- Ahmad, A. et al., 2011. Quercetin protects against oxidative stress associated damages in a rat model of transient focal cerebral ischemia and reperfusion. *Neurochemical Research*, 36, pp.1360–1371.
- Akbay, P., Basaran, A.A. & Basaran, N., 2003. In vitro immunomodulatory activity of flavonoid glycosides from *Urtica dioica* L. *Phytotherapy Research*, 17, pp.34–37.
- Alberti, A. et al., 2014. Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. *Food Chemistry*, 149, pp.151–158. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.086>.
- Alisi, C.S. et al., 2008. Decreased cardiovascular risk and resistance to hyperlipemia-induced hepatic damage in rats by aqueous extract of *Urtica dioica*. *African Journal of Biochemistry Research*, 2(4), pp.102–106.
- Andersen, H.R. et al., 1997. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clinical Chemistry*, 43(4), pp.562–568.
- Annapurna, A. et al., 2009. Cardioprotective actions of two bioflavonoids, quercetin and

- 
- rutin, in experimental myocardial infarction in both normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 61, pp.1365–1374.
- Antolovich, M. et al., 2000. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *The Analyst*, 125, pp.989–1009.
- Appeldoorn, M.M. et al., 2009. Some phenolic compounds increase the nitric oxide level in endothelial cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, pp.7693–7699.
- Ashokkumar, M. et al., 2008. Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: A preliminary study on a model system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, pp.155–160.
- Avcı, G. et al., 2006. Antihypercholesterolaemic and antioxidant activity assessment of some plants used as remedy in Turkish folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 107, pp.418–423. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874106001784>.
- Ayala, A., Muñoz, M.F. & Argüelles, S., 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, p.Article ID 360438.
- Baba, S. et al., 2007. Plasma LDL and HDL cholesterol and oxidized LDL concentrations are altered in normo- and hypercholesterolemic humans after intake of different levels of cocoa powder. *The Journal of nutrition*, 137, pp.1436–1441.
- Barbosa-Canovas, G. V., Rodriguez, J.J., 2002. Update on nonthermal food processing technologies: Pulsed electric field, high hydrostatic pressure, irradiation and ultrasound. *Food Australia*, 54(11), pp.513–520. Available at: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=13993285> [Accessed January 28, 2017].
- Barclay, L.R.C. et al., 2003. *The chemistry of phenols* Z. Rappoport, ed., John Wiley &

- 
- Sons, Ltd.
- Beevers, G., Lip, G.Y.H. & O'Brien, E., 2001. The pathophysiology of hypertension. *BJM Journals*, 322(7291), pp.912–916.
- Benzie, I.F.F., 1996. Lipid peroxidation: A review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 47, pp.233–261.
- 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, pp.70–76.
- Beutler, E., 1982. *Red blood cell metabolism, a manual of biochemical methods* 3rd ed., New York: Grune and Stratton.
- Biesaga, M. & Pyrzyń, K., 2013. Stability of bioactive polyphenols from honey during different extraction methods. *Food Chemistry*, 136, pp.46–54.
- Bitiren, M. et al., 2010. Protective effects of green tea (*Camelia sinensis*), *Hypericum perforatum* and *Urtica dioica* on hepatic injury and lymphocyte DNA damage induced by carbon tetrachloride in Wistar rats. *International Journal of Pharmacology*, 6(3), pp.241–248.
- Bnouham, M. et al., 2003. Antihyperglycemic activity of the aqueous extract of *Urtica dioica*. *Fitoterapia*, 74, pp.677–681.
- Bombardelli, E. & Morazzoni, P., 1997. *Urtica dioica* L. review. *Fitoterapia*, 68, pp.387–401.
- Bouayed, J. & Bohn, T., 2010a. Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(4), pp.228–237. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2010/267025/>.
- Bouayed, J. & Bohn, T., 2010b. Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(4), pp.228–237.
- Bourgou, S. et al., 2008. Phenolic composition and biological activities of Tunisian

- 
- Nigella sativa L. shoots and roots. *Comptes Rendus Biologies*, 331(1), pp.48–55.
- Brantner, A. & Grein, E., 1994. Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 44, pp.35–40.
- Briones, A.M. & Touyz, R.M., 2010. Oxidative stress and hypertension: current concepts. *Current Hypertension Reports*, 12, pp.135–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20424957>.
- Cáceras, A., Giron, L.M. & Martinez, A.M., 1987. Diuretic activity of plants used for the treatment of urinary ailments in Guatemala. *Journal of Ethnopharmacology*, 19, pp.233–245.
- Cai, H., Griendling, K.K. & Harrison, D.G., 2003. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24(9), pp.471–478.
- Camel, V., 2001. Recent extraction techniques for solid matrices—supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *The Analyst*, 126, pp.1182–1193. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b008243k>.
- Carocho, M. & Ferreira, I.C.F.R., 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, pp.15–25. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691512006941>.
- Carretero, O. & Oparil, S., 2000. Essential hypertension part I: Definition and etiology. *Circulation*, 101, pp.329–335.
- Cerra, M.C. et al., 2009. Nitrite modulates contractility of teleost (*Anguilla anguilla* and *Chionodraco hamatus*, i.e. the Antarctic hemoglobinless icefish) and frog (*Rana esculenta*) hearts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1787(7), pp.849–855. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.03.008>.
- Cetinus, E. et al., 2005. The role of *Urtica dioica* (Urticaceae) in the prevention of

- 
- oxidative stress caused by tourniquet application in rats. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 205, pp.215–221. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15718813>.
- Chahardehi, A.M., Ibrahim, D. & Sulaiman, S.F., 2009. Antioxidant activity and total phenolic content of some medicinal plants in Urticaceae family. *Journal of Applied Biological Sciences*, 3(2), pp.27–31.
- Chang, C.J., Wu, S.-M. & Yang, P.-W., 2001. High-pressure carbon dioxide and co-solvent extractions of crude oils from plant materials. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1, pp.187–191.
- Cheyrier, V. et al., 2013. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, pp.1–20. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>.
- Chirinos, R. et al., 2007. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. *Separation and Purification Technology*, 55, pp.217–225.
- Choi, J. et al., 2002. Prevention of nitric oxide-mediated induced parkinson's disease in mice by tea phenolic epigallocatechin 3-gallate. *NeuroToxicology*, 23, pp.367–374.
- Chrubasik, S. et al., 1997. Evidence for antirheumatic effectiveness of Herba Urticae dioicae in acute arthritis: A pilot study. *Phytomedicine*, 4(2), pp.105–108. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23195396>.
- Chua, L.S., 2013. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 150, pp.805–817. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.036>.
- Collier, H.J. & Chesher, G.B., 1956. Identification OF 5-hydroxytryptamine in the sting of the nettle (*Urtica dioica*). *British Journal of Pharmacology*, 11(2), pp.186–189.
- Cosby, K. et al., 2003. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nature Medicine*, 9(12), pp.1498–1505. Available at:



- 
- <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nm954>.
- Craft, B.D. et al., 2012. Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, pp.148–173.
- Crozier, A., Jaganath, I.B. & Clifford, M.N., 2009. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26, pp.1001–1043. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b802662a>.
- Crozier, A., Del Rio, D. & Clifford, M.N., 2010. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), pp.446–467. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098299710000762>.
- Czarnetzki, B.M., Thiele, T. & Rosenbach, T., 1990. Immunoreactive leukotrienes in nettle plants (*Urtica urens*). *International Archives of Allergy and Immunology*, 91, pp.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, pp.183–188.
- Dai, J. & Mumper, R.J., 2010. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15, pp.7313–7352.
- Van Damme, E.J.M., Broekaert, W.F. & Peumans, W.J., 1988. The *Urtica dioica* agglutinin is a complex mixture of isolectins. *Plant Physiology*, 86(2), pp.598–601.
- Das, M. et al., 2011. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic activity of *Urtica dioica* on type 2 diabetic model rats. *Journal of Diabetology*, 2(2), pp.1–6.
- Davidov-Pardo, G., Arozarena, I. & Marín-Arrozo, M.R., 2011. Stability of polyphenolic extracts from grape seeds after thermal treatments. *European Food Research and Technology*, 232, pp.211–220.
- Devaraj, S. et al., 2002. Supplementation with a pine bark extract rich in polyphenols increases plasma antioxidant capacity and alters the plasma lipoprotein profile. *Lipids*, 37(10), pp.931–934.

- 
- Ding, Z., Dai, Y. & Wang, Z., 2005. Hypouricemic action of scopoletin arising from xanthine oxidase inhibition and uricosuric activity. *Planta medica*, 71, pp.183–185.  
Available at:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15729630](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15729630).
- Dinis, T.C.P., Madeira, V.M.C. & Almeida, L.M., 1994. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315(1), pp.161–169.
- Dizaye, K.F., Alberzingi, B.O. & Sulaiman, S.R., 2013. Renal and vascular studies of aqueous extract of *Urtica dioica* in rats and rabbits. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 27(1), pp.25–31.
- Drabkin, D. & Austin, H., 1935. Spectrophotometric studies preparations from washed blood cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 244, pp.51–65.
- Dreyer, J. et al., 2002. Comparison of enzymatically separated hemp and nettle fibre to chemically separated and steam exploded hemp fibre. *Journal of Industrial Hemp*, 7, pp.43–59.
- Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F. & Bekhradnia, A.R., 2008. Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African Journal of Biotechnology*, 7(18), pp.3188–3192.
- Erlund, I. et al., 2000. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 56, pp.545–553.
- Esclapez, M.D. et al., 2011. Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. *Food Engineering Reviews*, 3(2), pp.108–120.
- Exarchou, V. et al., 2006. Hyphenated chromatographic techniques for the rapid screening and identification of antioxidants in methanolic extracts of pharmaceutically used plants. *Journal of Chromatography A*, 1112, pp.293–302.

- 
- Fang, Y.Z., Yang, S. & Wu, G., 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18, pp.872–879.
- Farag, M.A. et al., 2013. Phytochemistry of 43 *Urtica* accessions (stinging nettle) based on UPLC–Q–TOF–MS metabolomic profiles. *Phytochemistry*, 96, pp.170–183. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.09.016>.
- Figueirinha, A. et al., 2008. *Cymbopogon citratus* leaves: Characterisation of flavonoids by HPLC–PDA–ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. *Food Chemistry*, 110, pp.718–728.
- Fki, I. et al., 2005. Hypocholesterolemic effects of phenolic-rich extracts of Chemlali olive cultivar in rats fed a cholesterol-rich diet. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 13, pp.5362–5370.
- Green, L.C. et al., 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 126, pp.131–138.
- Grevsen, K., Fretté, X.C. & Christensen, 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 Science*, 73(1), pp.20–27.
- 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, pp.111–119.
- Gülçin, I. et al., 2004. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, 90, pp.205–215.
- Gutteridge, J.M.C., 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, 41(12), pp.1819–1828.
- Guyenet, P.G., 2006. The sympathetic control of blood pressure. *Nature reviews*, 7, pp.335–346. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16760914>.
- Hall, J.E., 2003. Historical perspective of the renin-angiotensin system. *Molecular*

- 
- Biotechnology*, 24, pp.27–39.
- Halliwell, B., Clement, M.V. & Long, L.H., 2000. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters*, 486(1), pp.10–13.
- 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, pp.346–348.
- Harrison, D.G. et al., 2007. Oxidative stress and hypertension. *Journal of the American Society of Hypertension*, 1(1), pp.30–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19427495>.
- Hensley, J. et al., 1997. Effects of calcium channel antagonists on Ca<sup>2+</sup> transients in rat and canine cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 29, pp.1037–1043.
- Ho, E. et al., 2013. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox biology*, 1, pp.483–91.
- Hord, N.G., Tang, Y. & Bryan, N.S., 2009. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *Am J Clin Nutr*, 90(6), pp.1–10.
- Hudec, J. et al., 2007. Antioxidant capacity changes and phenolic profile of *Echinacea purpurea*, nettle (*Urtica dioica* L.), and dandelion (*Taraxacum officinale*) after application of polyamine and phenolic biosynthesis regulators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, pp.5689–5696.
- Husain, S.R., Cilurd, J. & Cillard, P., 1987. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, 26(9), pp.2489–2491.
- Ince, A.E., Sahin, S. & Sumnu, G., 2012. Comparison of microwave and ultrasound-assisted extraction techniques for leaching of phenolic compounds from nettle. *Journal of Food Science and Technology*, 51(10), pp.2776–2782.
- Ivancheva, S. & Stantcheva, B., 2000. Ethnobotanical inventory of medicinal plants in Bulgaria. *Journal of Ethnopharmacology*, 69, pp.165–172.

- 
- Jaffe, E.A. & Weksler, B.B., 1979. Recovery of endothelial cell prostacyclin production after inhibition by low doses of aspirin. *Journal of Clinical Investigation*, 63, pp.532–535.
- Jaganath, I.B. et al., 2006. The relative contribution of the small and large intestine to the absorption and metabolism of rutin in man. *Free Radical Research*, 40(10), pp.1035–1046.
- Jančić, R., 2013. *Botanika farmaceutika* 5th ed., Beograd.
- Jensen, F.B., 2009. The role of nitrite in nitric oxide homeostasis: A comparative perspective. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1787(7), pp.841–848. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabbio.2009.02.010>.
- Josifović, M., 1977. *Flora SR Srbije II* M. Josifovic, ed., Beograd: Srpska akademija nauka i umetnosti, odeljenje prirodno-matematičkih nauka.
- Jovović, Đ., Mihailović-Stanojević, N. & Miloradović, Z., 2003. Endotelna disfunkcija i hipertenzija. *Glasnik Instituta za štitastu žlezdu i metabolizam "Zlatibor"*, 6(7), pp.7–20.
- Ju, H.-Y. et al., 2012. Antioxidant phenolic profile from ethyl acetate fraction of *Fructus Ligustri Lucidi* with protection against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in SH-SY5Y cells. *Food and Chemical Toxicology*, 50, pp.492–502. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22142696>.
- Junior, M.R.M., Leite, A.V. & Dragano, N.R.V., 2014. Supercritical fluid extraction and stabilization of phenolic compounds from natural sources. *The Open Chemical Engineering Journal*, 4, pp.51–60.
- Kamalakkannan, N. & Prince Mainzen Stanely, P., 2006. Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 98(1), pp.97–103.
- Kampa, M. et al., 2002. A new automated method for the determination of the Total

- 
- Antioxidant Capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay. *BMC Clinical Pathology*, 2(3), pp.1–16.
- Kandis, H. et al., 2010. Effects of *Urtica dioica* on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Clinics*, 65(12), pp.1357–1361.
- Kanter, M. et al., 2003. Effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and some liver enzymes in CCl<sub>4</sub>-treated rats. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 50, pp.264–268.
- Karakaya, S., 2004. Bioavailability of phenolic compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, pp.453–464.
- Keil, L.C., Summy-Long, J. & Severs, W.B., 1975. Release of vasopressin by angiotensin II. *Endocrinology*, 96(4), pp.1063–1065.
- Khoddami, A., Wilkes, M.A. & Roberts, T.H., 2013. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18, pp.2328–2375.
- Klabunde, R., 2012. *Cardiovascular physiology concepts* 2nd ed. Crystal Taylor, ed., Philadelphia: Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins.
- Kohan, D.E. et al., 2011. Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. *Physiological Reviews*, 91, pp.1–77.
- Kohen, R. & Nyska, A., 2002. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6), pp.620–650.
- Komes, D. et al., 2011. Phenolic composition and antioxidant properties of some traditionally used medicinal plants affected by the extraction time and hydrolysis. *Phytochemical Analysis*, 22(2), pp.172–180.
- Kono, Y. et al., 1998. Iron chelation by chlorogenic acid as a natural antioxidant. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62(1), pp.22–27.
- Kukrić, Z.Z. et al., 2012. Characterization of antioxidant and antimicrobial activities of nettle leaves (*Urtica dioica* L.). *Acta Periodica Technologica*, 43, pp.257–272.

- 
- Kumaran, A. & Joel Karunakaran, R., 2007. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT - Food Science and Technology*, 40(2), pp.344–352.
- Kwon, S. et al., 2010. Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. *European Journal of Pharmacology*, 649, pp.210–217. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.001>.
- Lafay, S. & Gil-Izquierdo, A., 2008. Bioavailability of phenolic acids. *Phytochemistry Reviews*, 7(2), pp.301–311.
- Lapornik, B., Prošek, M. & Golc Wondra, A., 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71, pp.214–222.
- Lee, S.-M. et al., 2013. Quercetin up-regulates expressions of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , liver X receptor  $\alpha$ , and ATP binding cassette transporter A1 genes and increases cholesterol efflux in human macrophage cell line. *Nutrition Research*, 33, pp.136–143. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23399664>.
- Lee, S.E. et al., 2003. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Sciences*, 73, pp.167–179. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320503002595>.
- Legssyer, A. et al., 2002. Cardiovascular effects of *Urtica dioica* L. in isolated rat heart and aorta. *Phytotherapy Research*, 16, pp.503–507.
- Leikert, J.F. et al., 2002. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide from endothelial cells. *Circulation*, pp.1614–1617.
- Li, H. et al., 2004. Flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) up-regulate endothelial-type nitric-oxide synthase gene expression in human endothelial cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 310(3), pp.926–932.

- 
- Lichtenthaler, H.K. & Schweiger, J., 1998. Cell wall bound ferulic acid, the major substance of the blue-green fluorescence emission of plants. *Journal of Plant Physiology*, 152, pp.272–282. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617\(98\)80142-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617(98)80142-9).
- Lifton, R.P., Gharavi, A.G. & Geller, D.S., 2001. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell*, 104(4), pp.545–556.
- Lin, M.-C., Tsai, M.-J. & Wen, K.-C., 1999. Supercritical fluid extraction of flavonoids from *Scutellariae radix*. *Journal of Chromatography A*, 830, pp.387–395.
- Liu, X. et al., 2008. Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.) from six regions in China. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(3), pp.219–228.
- Liyana-Pathirina, C. & Shahidi, F., 2005. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, 93, pp.47–56. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814604006910>.
- Lundberg, J.O., Weitzberg, E. & Gladwin, M.T., 2008. The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature reviews*, 7(2), pp.156–167. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrd2466>.
- Lusis, A., 2010. Atherosclerosis. *Nature*, 407(6801), pp.233–241.
- Mahlangeni, N.T., Moodley, R. & Jonnalagadda, S.B., 2016. The distribution of macronutrients, anti-nutrients and essential elements in nettles, *Laportea peduncularis* susp. *peduncularis* (River nettle) and *Urtica dioica* (Stinging nettle). *Journal of Environmental Science and Health*, 51(3), pp.160–169.
- Mancia, G. et al., 2013. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension. *Journal of Hypertension*, 31, pp.1281–1357.
- De Marchi, U. et al., 2009. Quercetin can act either as an inhibitor or an inducer of the mitochondrial permeability transition pore: A demonstration of the ambivalent



- 
- redox character of polyphenols. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1787, pp.1425–1432. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabbio.2009.06.002>.
- Mason, D.T., Zelis, R. & Amsterdam, E.A., 1971. Actions of the nitrites on the peripheral circulation and myocardial oxygen consumption: significance in the relief of angina pectoris. *Chest*, 59(3), pp.296–305. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001236921662250X>.
- Matés, J.M., 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153, pp.83–104. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X00003061>.
- Matés, J.M., Pérez-Gómez, C. & Núñez de Castro, I., 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*, 32(8), pp.595–603.
- Mehta, P.K. & Griendling, K.K., 2007. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 292(1), pp.C82–C97.
- Meng, S. et al., 2013. Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: A review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, p.Article ID 801457.
- Mihailovic-Stanojevic, N. et al., 2016. Upregulation of heme oxygenase-1 in response to wild thyme treatment protects against hypertension and oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, p.Article ID 1458793.
- Miloradovic, Z. et al., 2007. Effects of long-term losartan and L-arginine treatment on haemodynamics, glomerular filtration, and SOD activity in spontaneously hypertensive rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 86, pp.210–214.
- Misra, Hara, P. & Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of biological chemistry*, 247(5), pp.3170–3175.

- 
- Mohrman, D. & Heller, L., 2014. *Cardiovascular Physiology* 8th ed., McGraw-Hill Education.
- Montenegro, M.F. et al., 2012. Antihypertensive and antioxidant effects of a single daily dose of sodium nitrite in a model of renovascular hypertension. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 385, pp.509–517.
- Montezano, A.C. & Touyz, R.M., 2012. Molecular mechanisms of hypertension — Reactive oxygen species and antioxidants: A basic science update for the clinician. *Canadian Journal of Cardiology*, 28(3), pp.288–295. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cjca.2012.01.017>.
- Morand, C. et al., 2000. Quercetin 3-O- $\beta$ -glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma. *Free Radical Research*, 33, pp.667–676.
- Morris, S.M., Billiar, R. & Sidney, M., 1994. New insights into the regulation nitric oxide synthesis of inducible. *The American Physiological Society*, 266, pp.829–839.
- Nakazono, K. et al., 1991. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, pp.10045–10048. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=52864&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Nassiri-Asl, M. et al., 2009. Effects of *Urtica dioica* extract on lipid profile in hypercholesterolemic rats. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 7(5), pp.428–433.
- Nencu, I. et al., 2013. Preliminary research regarding the therapeutic uses of *Urtica urens* L. and *Urtica dioica* L. *Farmacia*, 61(2), pp.276–283.
- Ningappa, M.B., Dinesha, R. & Srinivas, L., 2008. Antioxidant and free radical scavenging activities of polyphenol-enriched curry leaf (*Murraya koenigii* L.) extracts. *Food Chemistry*, 106(2), pp.720–728.

- 
- Nishida, S. & Satoh, H., 2009. Possible involvement of Ca activated K in the quercetin-induced vasodilatation channels, SK channel, in the quercetin-induced vasodilatation. *The Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 13, pp.361–365.
- Ohara, K. et al., 2013. Biochemical and biophysical research communications quercetin-3-O-glucuronide induces ABCA1 expression by LXR a activation in murine macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 441, pp.929–934.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. & Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95, pp.351–358.
- Olthof, M.R., Hollman, P.C.H. & Katan, M.B., 2001. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *Journal of Nutrition*, pp.66–71.
- Onmez, G.D. et al., 2002. The Effects of losartan and enalapril therapies on the levels of nitric oxide, malondialdehyde, and glutathione in patients with essential hypertension. *Japanese Journal of Physiology*, 52, pp.435–440.
- Orčić, D. et al., 2014. Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food Chemistry*, 143, pp.48–53.
- Otles, S. & Yalcin, B., 2012. Phenolic compounds analysis of root, stalk, and leaves of nettle. *The Cientific World Journal*, 2012, p.Article ID564367.
- 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, pp.405–415.
- Özkan, A. et al., 2011. Evaluation of antioxidant activities and phenolic contents of some edible and medicinal plants from Turkey's flora. *Advances in Environmental Biology*, 5(2), pp.231–236.
- Özkol, H. et al., 2012. Ameliorative influence of *Urtica dioica* L. against cisplatin-

- 
- induced toxicity in mice bearing Ehrlich ascites carcinoma. *Drug and Chemical Toxicology*, 35(3), pp.251–257.
- Paniwnyk, L. et al., 2001. The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, pp.299–301.
- Paul, M., Mehr, A.P. & Kreutz, R., 2006. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiological Reviews*, 86, pp.747–803.
- Pellegrino, D. et al., 2009. Nitrite exerts potent negative inotropy in the isolated heart via eNOS-independent nitric oxide generation and cGMP-PKG pathway activation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1787(7), pp.818–827. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabbio.2009.02.007>.
- Pereira, T.M.C. et al., 2009. Endogenous angiotensin II modulates nNOS expression in renovascular hypertension. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42(7), pp.685–691.
- Ph. Eur., 2011. *European Pharmacopoeia* 7th ed., Strasbourg: Council of Europe (COE) – European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM).
- Phyllis, H.A. & Panisset, T.E., 1934. The quantitative determination of minute amounts of chlorophyll. *New Phytologist*, 33(3), pp.199–210.
- Piñeiro, Z., Palma, M. & Barroso, C.G., 2004. Determination of catechins by means of extraction with pressurized liquids. *Journal of Chromatography A*, 1026, pp.19–23.
- Pinelli, P. et al., 2008. Extraction and HPLC analysis of phenolic compounds in leaves, stalks, and textile fibers of *Urtica dioica* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, pp.9127–9132.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J. & Shahabimajd, N., 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5(11), pp.1142–1145.
- Prasad, K.N. et al., 2011. Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised *Mangifera pajang* Kosterm.

- 
- peels. *Food Chemistry*, 128, pp.1121–1127.
- Proestos, C. et al., 2006. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 95, pp.664–671.
- Qayyum, R. et al., 2016. Mechanisms underlying the antihypertensive properties of *Urtica dioica*. *Journal of Translational Medicine*, 14(254), pp.1–13.
- Rafikov, R. et al., 2011. eNOS activation and NO function: Structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. *Journal of Endocrinology*, 210(3), pp.271–284.
- Randall, C. et al., 2008. Nettle sting for chronic knee pain: A randomised controlled pilot study. *Complementary Therapies in Medicine*, 16, pp.66–72.
- Rau, O. et al., 2006. Screening of herbal extracts for activation of the human peroxisome proliferator-activated receptor. *Pharmazie*, 61(11), pp.952–956.
- Re, R. et al., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), pp.1231–1237.
- Redón, J. et al., 2003. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension*, 41, pp.1096–1101.
- Reis Giada, M. de L., 2013. Food phenolic compounds: Main classes, sources and their antioxidant power. In J. A. Morales-González, ed. *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases-A Role for Antioxidants*. Rijeka: InTech, pp. 87–112.
- Del Rio, D. et al., 2013. Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & redox signaling*, 18(14), pp.1818–1892. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3619154&tool=pmcencetrez&rendertype=abstract>.
- Robards, K., 2003. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1000, pp.657–691.

- 
- Robaszekiewicz, A., Balcerczyk, A. & Bartosz, G., 2007. Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell Biology International*, 31, pp.1245–1250.
- Rodis, P.S., Karathanos, V.T. & Mantzavinou, A., 2002. Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, pp.596–601.
- Rose, E.F. & Jacot Guillarmod, A., 1974. Plants gathered as foodstuffs by the Transkeian peoples. *South African Medical Journal*, 48(39), pp.1688–1690.
- Rosnitschek-Schimmel, I., 1985. Seasonal dynamics of nitrogenous compounds in a nitrophilic weed I. Changes in inorganic and organic nitrogen fractions of the different plant parts of *Urtica dioica*. *Plant and Cell Physiology*, 26(1), pp.169–176.
- Sabo, C., Ischiropoulos, H. & Radi, R., 2007. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature*, 6, pp.662–680.
- Sáez, G.T. & Redon, J., 2003. Oxidative stress in hypertension. *A Revista Brasileira de Hipertensao*, 10(4), pp.239–249.
- Saibabu, V. et al., 2015. Therapeutic potential of dietary phenolic acids. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2015, p.Article ID 823539.
- Sajfrtová, M. et al., 2005. Near-critical extraction of  $\beta$ -sitosterol and scopoletin from stinging nettle roots. *The Journal of Supercritical Fluids*, 35, pp.111–118.
- Sandoo, A. et al., 2010. The endothelium and its role in regulating vascular tone. *The Open Cardiovascular Medicine Journal*, 4, pp.302–312.
- Santos-Buelga, C. & Williamson, G., 2003. *Methods in Polyphenol Analysis*, London: Royal Society of Chemistry, RSC Publishing.
- Satoh, H., 2004. Comparative electropharmacological actions of some constituents from ginkgo biloba extract in guinea-pig ventricular cardiomyocytes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1(3), pp.277–284.
- Sharma, J.N. et al., 1996. Blood pressure regulation by the kallikrein-kinin system. *General Pharmacology*, 27(1), pp.55–63.

- 
- Sharma, J.N., 2009. Hypertension and the bradykinin system. *Current hypertension reports*, 11, pp.178–181. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19442326>.
- Sharma, J.N., 2006. Role of tissue kallikrein–kininogen–kinin pathways in the cardiovascular system. *Archives of Medical Research*, 37, pp.299–306.
- Shi, J. et al., 2005. Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods - engineering and technology. *Food Reviews International*, 21(1), pp.139–166.  
Available at: %5C%5CRobsrv-05%5Creference manager%5CArticles%5C9709.pdf.
- Shirsath, S.R., Sonawane, S.H. & Gogate, P.R., 2012. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations-A review of current status. *Chemical Engineering and Processing*, 53, pp.10–23. Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cep.2012.01.003>.
- Shouqin, Z., Jun, X. & Changzheng, W., 2005. High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from propolis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80, pp.50–54.
- Silva, C.G. et al., 2005. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. *Pharmacological Research*, 52, pp.229–233.
- Silva, E., Rogez, H. & Larondelle, Y., 2007. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 55, pp.381–387.
- Simopoulos, A.P., 2000. Human requirement for N-3 polyunsaturated fatty acids. *Poultry Science*, 79, pp.961–970.
- Soria, A.C. & Villamiel, M., 2010. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 21, pp.323–331.
- Southan, G.J. & Szabo, C., 1996. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochemical Pharmacology*, 51, pp.383–394.

- 
- Sovová, H. et al., 2004. Near-critical extraction of pigments and oleoresin from stinging nettle leaves. *Journal of Supercritical Fluids*, 30, pp.213–224.
- Spina, M. et al., 2008. Comparative evaluation of flavonoid content in assessing quality of wild and cultivated vegetables for human consumption. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, pp.294–304.
- Staessen, J.A. et al., 2003. Essential hypertension. *Lancet*, 361(9369), pp.1629–1641.
- Stanely, M.P.P. & Kannan, N.K., 2006. Protective effect of rutin on lipids, lipoproteins, lipid metabolizing enzymes and glycoproteins in streptozotocin-induced diabetic rats. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 58(10), pp.1373–1383. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17034661>.
- Stanojević, L.P. et al., 2016. The effect of extraction techniques on yield, extraction kinetics and antioxidant activity of aqueous-methanolic extracts from nettle (*Urtica dioica* L.) leaves. *Separation Science and Technology*, 51, pp.1817–1829.
- Stepanović, B. & Radanović, D., 2011. *Tehnologija gajenja lekovitog bilja u Srbiji*, Beograd: Institut za proučavanje lekovitog bilja “Dr Josif Pančić.”
- Stević, T. et al., 2010. Antioxidant, cytotoxic, and antimicrobial activity of *Alnus incana* (L.) ssp. *incana* Moench and *A. viridis* (Chaix) DC ssp. *viridis* extracts. *Journal of Medicinal Food*, 13(3), pp.700–704.
- Suchan, P. et al., 2004. Pressurized liquid extraction in determination of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in fish samples. *Analytica Chimica Acta*, 520, pp.193–200.
- Sullivan, J.C. et al., 2010. Renal NOS activity, expression, and localization in male and female spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 298(51), pp.R61–R69.
- Sutherland, B.A. et al., 2004. Neuroprotective effects of (–)-epigallocatechin gallate after hypoxia-ischemia-induced brain damage: novel mechanisms of action. *The FASEB journal*, pp.1–22.



- 
- Szentmihályi, K., Marczal, G. & Then, M., 2006. Medicinal plants in view of trace elements. *Thaiszia-Journal of Botany*, 16, pp.99–107.
- Taddei, S. et al., 2003. Mechanisms of endothelial dysfunction: Clinical significance and preventive non-pharmacological therapeutic strategies. *Current Pharmaceutical Design*, 9, pp.2385–2402.
- Taddei, S. et al., 1998. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation*, 97, pp.2222–2229.
- Tahri, A. et al., 2000. Acute diuretic, natriuretic and hypotensive effects of a continuous perfusion of aqueous extract of *Urtica dioica* in the rat. *Journal of Ethnopharmacology*, 73, pp.95–100.
- Tan, M.C., Tan, C.P. & Ho, C.W., 2013. Effects of extraction solvent system, time and temperature on total phenolic content of henna (*Lawsonia inermis*) stems. *International Food Research Journal*, 20(6), pp.3117–3123.
- Testai, L. et al., 2002. Cardiovascular effects of *Urtica dioica* L. (Urticaceae) roots extracts: in vitro and in vivo pharmacological studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 81, pp.105–109.
- Tojo, A., Onozato, M.L. & Fujita, T., 2006. Role of macula densa neuronal nitric oxide synthase in renal diseases. *Medical Molecular Morphology*, 39(1), pp.2–7.
- Toldy, A. et al., 2009. The beneficial effects of nettle supplementation and exercise on brain lesion and memory in rat. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20, pp.974–981. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.09.001>.
- Toldy, A. et al., 2005. The effect of exercise and nettle supplementation on oxidative stress markers in the rat brain. *Brain Research Bulletin*, 65, pp.487–493.
- Touyz, R.M. & Schiffrin, E.L., 2004. Reactive oxygen species in vascular biology: Implications in hypertension. *Histochemistry and Cell Biology*, 122(4), pp.339–352.
- Tsao, R. & Deng, Z., 2004. Separation procedures for naturally occurring antioxidant

- 
- phytochemicals. *Journal of Chromatography B*, 812, pp.85–99.
- Tura, D. & Robards, K., 2002. Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. *Journal of Chromatography A*, 975(1), pp.71–93.
- Türkdoğan, M.K. et al., 2003. The role of *Urtica dioica* and *Nigella sativa* in the prevention of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Phytotherapy Research*, 17, pp.942–946.
- Turkmen, N., Sari, F. & Velioglu, Y.S., 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. *Food Chemistry*, 99, pp.835–841.
- Ueda, E.K.M., Gout, P.W. & Morganti, L., 2003. Current and prospective applications of metal ion-protein binding. *Journal of Chromatography A*, 988(1), pp.1–23.
- Ugusman, A. et al., 2014. Role of rutin on nitric oxide synthesis in human umbilical vein endothelial cells. *The Scientific World Journal*, 2014, p.Article ID 169370.
- Upton, R., 2013. Stinging nettles leaf (*Urtica dioica* L.): Extraordinary vegetable medicine. *Journal of Herbal Medicine*, 3, pp.9–38. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hermed.2012.11.001>.
- Uttara, B. et al., 2009. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, 7(1), pp.65–74.
- Vermerris, W. & Nicholson, R., 2008. Families of phenolic compounds and means of classification. In *Phenolic Compound Biochemistry*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 1–34.
- Versari, D. et al., 2009. Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. *British Journal of Pharmacology*, 157, pp.527–536.
- Vicente-Sánchez, C. et al., 2008. Effect of the flavonoid quercetin on cadmium-induced

- 
- hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 46, pp.2279–2287.
- Vilkhu, K. et al., 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, pp.161–169.
- Vinatoru, M., 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(3), pp.303–313.
- Di Virgilio, N. et al., 2015. The potential of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as a crop with multiple uses. *Industrial Crops and Products*, 68, pp.42–49.
- Vuleta, G., 2012. *Farmaceutska tehnologija*, Beograd: Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Wallerath, T. et al., 2003. Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects. *Journal of the American College of Cardiology*, 41(3), pp.471–478.
- Wan, C.-W. et al., 2013. Chlorogenic acid exhibits cholesterol lowering and fatty liver attenuating properties by up-regulating the gene expression of PPAR- $\alpha$  in hypercholesterolemic rats induced with a high-cholesterol diet. *Phytotherapy Research*, 27(4), pp.545–551.
- Wanasundara, P.K.J.P.D., Shahidi, F. & Shukla, V.K.S., 1997. Endogenous antioxidants from oilseeds and edible oils. *Food Reviews International*, 13(2), pp.225–292.  
Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0031285757&partnerID=tZOtx3y1>.
- Wang, Y. & Golledge, J., 2013. Neuronal nitric oxide synthase and sympathetic nerve activity in neurovascular and metabolic systems. *Current Neurovascular Research*, 10, pp.81–89.
- Whelton, P.K. et al., 2017. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure

- 
- in adults. *Journal of the American College of Cardiology*, pp.1–193. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.11.006>.
- Yamaguchi, F. et al., 2000. Antioxidative and anti-glycation activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, pp.180–185.
- Yang, H.-Y. et al., 2007. Effects of the angiotensin II type 1 receptor antagonist valsartan on the expression of superoxide dismutase in hypertensive patients. *Journal of Clinical Pharmacology*, 47, pp.397–403.
- Ye, S. et al., 2002. Losartan reduces central and peripheral sympathetic nerve activity in a rat model of neurogenic hypertension. *Hypertension*, 39, pp.1101–1107.
- Yetik-Anacak, G. & Catravas, J.D., 2006. Nitric oxide and the endothelium: History and impact on cardiovascular disease. *Vascular Pharmacology*, 45(5), pp.268–276.
- Yıldız, L. et al., 2008. Combined HPLC-CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay of parsley, celery leaves, and nettle. *Talanta*, 77, pp.304–313.
- Yuan, Y. V, Kitts, D.D. & Godin, D. V, 1996. Heart and red blood cell antioxidant status and plasma lipid levels in the spontaneously hypertensive and normotensive Wistar–Kyoto rat. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 74, pp.290–297.
- Zanotti, I. et al., 2015. Atheroprotective effects of (poly)phenols: a focus on cell cholesterol metabolism. *Food & Function*, 6(13), pp.13–31. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4FO00670D>.
- Zhan, C. et al., 2004. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the spontaneously hypertensive rat kidney: effect of antioxidant-rich diet. *Journal of Hypertension*, 22(10), pp.2025–2033.
- Zhishen, J., Mengcheng, T. & Jianming, W., 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), pp.555–559.

---

Zhou, J. et al., 1993. Protective effect of chlorogenic acid on lipid peroxidation in the liver of rats induced by carbon tetrachloride or Co-irradiation. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 15, pp.119–125.

Ziyyat, A. et al., 1997. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *Journal of Ethnopharmacology*, 58, pp.45–54.

---

## Садржај слика

**Слика 1.1.** Рецептори и сигнални путеви који учествују у регулацији контракције глатко-мишићних ћелија. *R*, рецептор; стимулаторни *G*-протеин; *Gq*, фосфолипаза *C* повезана са *G*-протеином; *AC*, аденил циклаза; *PL-C*, фосфолипаза *C*; *PIP2*, фосфатидилинозитол 4,5-бифосфат; *IP3*, инозитол трифосфат; *DAG*, диацил глицерол; *PK-C*, протеин киназа *C*; *SR*, саркоплазматични ретикулум; *MLCK*, киназа лаког ланца миозина; *Ado*, аденозин; *PGI2*, простаглицин; *Epi*, епинефрин; *NO*, азот моноксид; *GC*, гуанил циклаза; *Ang II*, ангиотензин II; *ET-1*, ендотелин-1; *NE*, норепинефрин; *ACh*, ацетилхолин; *AVP*, аргинин вазопресин; *GDP*, гуанозин дифосфат; *GTP*, гуанозин трифосфат; *ATP*, аденозин трифосфат; *cAMP*, циклични аденозин монофосфат; *cGMP*, циклични гуанозин монофосфат (Klabunde 2012).....12

**Слика 1.2.** Ренин-ангиотензин-алдостерон систем (Ариа Рад, 2006 доступно на: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a2/Renin-angiotensin-aldosterone\\_system.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a2/Renin-angiotensin-aldosterone_system.png), датум приступа 3.3.2017.).....13

**Слика 1.3.** Механизам оксидативног стреса у хипертензији (Sáez & Redon 2003).....16

**Слика 1.4.** Везивање ангиотензина II за *AT<sub>1</sub>* рецептор и активација васкуларне *NADPH* оксидазе. *NOX*, *p22<sup>phox</sup>*, *p47<sup>phox</sup>* и *Rac GTP*, субјединице *NADPH*; *eNOS*, ендотелна *NO* синтаза; *O<sup>2•-</sup>*, супероксидни радикал; *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*, водоник пероксид; *ONOO<sup>-</sup>*, пероксинитрит; *NO*, азотни моноксид; *PKC*, *p38 MAPK*, *PI3K Akt*, *ERK 1* и *2*, *PTKs*, *JAK2*, *STATs*, *NF-κB*, *HIF-1α*, *MCP-1*, *IL-6*; *VCAM*, *ICAM* и *VEGF*, специфични молекули који учествују у преносу ћелијских сигнала (Cai et al. 2003).....17

Слика 1.5. Најважније подкласе флавоноида.....	23
Слика 3.1. Шематски приказ оптимизације екстракције <i>TP</i> из листа коприве.....	50
Слика 3.2. Уређај 9800TCR <i>Cardiomax III-TCR</i> коришћен за хемодинамска мерења.....	59
Слика 3.3. Приказ записа хемодинамских параметара мерених уређајем 9800TCR <i>Cardiomax III-TCR</i> .....	60
Слика 3.4. Регистратор протока крви кроз каротидну, реналну артерију и аорту.....	61
Слика 3.5. Метаболички кавез коришћен за колекцију 24-часовног урина.....	62
Слика 3.6. Биохемијски анализатор <i>COBAS INTEGRA 400 plus</i> .....	73
Слика 4.1. Хроматограм 50% <i>MeOH</i> екстракта листа коприве (трајање екстракције 30 min) ( $\lambda=280$ nm) (A) хлорогенска киселина, (B) 2- <i>O</i> -кафеоил мална киселина и (C) рутин.....	78
Слика 4.2. Парето дијаграм утицаја % <i>MeOH</i> ( $X_1$ ) и трајања екстракције ( $X_2$ ) на принос <i>TP</i> .....	82
Слика 4.3. Зависност <i>TP</i> садржаја у екстракту листа коприве од процента метанола у екстракционом средству (% <i>MeOH</i> ) и трајања екстракције ( $t$ ).....	83
Слика 4.4. Систолни, дијастолни и средњи артеријски крвни притисак код експерименталних животиња	
<i>SHR</i> – спонтано хипертензивни пацови, <i>SHRC</i> - контролна група, <i>SHR+L</i> - позитивна контролна група (10 mg/kg на дан лосартан), <i>SHR+UE10</i> , <i>SHR+UE50</i> и <i>SHR+UE200</i> - групе које су примале <i>UE</i> у дози од 10, 50 и 200 mg/kg на дан, редом ( $^{\#} p < 0,05$ , $^{**} p < 0,01$ и $^{***} p < 0,001$ у поређењу са <i>SHRC</i> и $^{\#} p < 0,05$ у поређењу са <i>SHR+L</i> ).....	92

---

**Слика 4.5.** Минутни волумен срца, ударни волумен срца, укупни периферни васкуларни отпор и фреквенца срца код експерименталних животиња

*SHR* – спонтано хипертензивни пацови, *SHRC* - контролна група, *SHR+L* - позитивна контролна група (10 mg/kg на дан лосартан), *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200* - групе које су примале *UE* у дози од 10, 50 и 200 mg/kg на дан, редом (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  и \*\*\*  $p < 0,001$  у поређењу са *SHRC*, #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  и ###  $p < 0,001$  у поређењу са *SHR+L* и †  $p < 0,05$  и ††  $p < 0,01$  у поређењу са *SHR+UE50*).....93

**Слика 4.6.** Проток крви кроз каротидну, реналну артерију и аорту и отпор протоку крви кроз каротидну, реналну артерију и аорту код експерименталних животиња

*SHR* – спонтано хипертензивни пацови, *SHRC* - контролна група, *SHR+L* - позитивна контролна група (10 mg/kg на дан лосартан), *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200* - групе које су примале *UE* у дози од 10, 50 и 200 mg/kg на дан, редом (\*  $p < 0,05$  у поређењу са *SHR+L*, ††  $p < 0,01$  у поређењу са *SHR+UE50* и §  $p < 0,05$  у поређењу са *SHR+UE200*).....94

**Слика 4.7.** Активност ензима антиоксидативне заштите супероксид дисмутаза (*SOD*), каталазе (*CAT*), глутатион пероксидазе (*GSH-Px*) и глутатион редуктазе (*GR*) у еритроцитима експерименталних животиња

*SHR* – спонтано хипертензивни пацови, *SHRC* - контролна група, *SHR+L* - позитивна контролна група (10 mg/kg на дан лосартан), *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200* - групе које су примале *UE* у дози од 10, 50 и 200 mg/kg на дан, редом (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  и \*\*\*  $p < 0,001$  у поређењу са *SHRC* и #  $p < 0,05$  и ###  $p < 0,001$  у поређењу са *SHR+L*).....96

**Слика 4.8.** Експресија супероксид дисмутаза (*SODe*), каталазе (*CATe*) и глутатион пероксидазе (*GSH-Pxe*) у еритроцитима експерименталних животиња

*SHR* – спонтано хипертензивни пацови, *SHRC* - контролна група, *SHR+L* - позитивна контролна група (10 mg/kg на дан лосартан), *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200* - групе које су примале *UE* у дози од 10, 50 и 200 mg/kg на дан, редом (\*\*\*  $p < 0,001$  у поређењу са *SHRC* и §§  $p < 0,01$  и \$\$\$  $p < 0,001$  у поређењу са *SHR+UE200*).....97



---

**Слика 4.9.** Антиоксидативни капацитет плазме (*TEACp* и *FRAPp*) код експерименталних животиња

*SHR* – спонтано хипертензивни пацови, *SHRC* - контролна група, *SHR+L* - позитивна контролна група (10 mg/kg на дан лосартан), *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200* - групе које су примале *UE* у дози од 10, 50 и 200 mg/kg на дан, редом (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  и \*\*\*  $p < 0,001$  у поређењу са *SHRC* и #  $p < 0,05$  и ##  $p < 0,01$  у поређењу са *SHR+L*).....98

**Слика 4.10.** Степен липидне пероксидације у плазми (*TBARSp*), еритроцитима (*TBARSe*) и урину (*TBARSi*) код експерименталних животиња

*SHR* – спонтано хипертензивни пацови, *SHRC* - контролна група, *SHR+L* - позитивна контролна група (10 mg/kg на дан лосартан), *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200* - групе које су примале *UE* у дози од 10, 50 и 200 mg/kg на дан, редом (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  и \*\*\*  $p < 0,001$  у поређењу са *SHRC*, #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  и ###  $p < 0,001$  у поређењу са *SHR+L* и \$  $p < 0,05$ , \$\$  $p < 0,01$  и \$\$\$  $p < 0,001$  у поређењу са *SHR+UE200*).....100

**Слика 4.11.** Садржај укупних нитрата и нитрита (*NOx*) и само нитрита (*NO<sub>2</sub><sup>-</sup>*) у плазми и урину експерименталних животиња

*SHR* – спонтано хипертензивни пацови, *SHRC* - контролна група, *SHR+L* - позитивна контролна група (10 mg/kg на дан лосартан), *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200* - групе које су примале *UE* у дози од 10, 50 и 200 mg/kg на дан, редом (\*  $p < 0,05$  и \*\*  $p < 0,01$  у поређењу са *SHRC* и #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  и ###  $p < 0,001$  у поређењу са *SHR+L*).....102

**Слика 4.12.** Укупни холестерол, *HDL*, триглицериде и *LDL* у плазми експерименталних животиња

*SHR* – спонтано хипертензивни пацови, *SHRC* - контролна група, *SHR+L* - позитивна контролна група (10 mg/kg на дан лосартан), *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200* - групе које су примале *UE* у дози од 10, 50 и 200 mg/kg на дан, редом (\*  $p < 0,05$  у поређењу са *SHRC*, #  $p < 0,05$  у поређењу са *SHR+L* и \$\$  $p < 0,01$  у поређењу са *SHR+UE200*).....104

---

**Слика 4.13.** Укупни холестерол/*HDL* и *LDL/HDL* у плазми експерименталних животиња

*SHR* – спонтано хипертензивни пацови, *SHRC* - контролна група, *SHR+L* - позитивна контролна група (10 mg/kg на дан лосартан), *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200* - групе које су примале *UE* у дози од 10, 50 и 200 mg/kg на дан, редом (\*\*  $p < 0,01$  и \*\*\*  $p < 0,001$  у поређењу са *SHRC*, #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  у поређењу са *SHR+L* и \$  $p < 0,05$  у поређењу са *SHR+UE200*).....105

**Слика 4.14.** Експресија *iNOS*, *eNOS* и *nNOS* у бубрегу експерименталних животиња

*SHR* – спонтано хипертензивни пацови, *SHRC* - контролна група, *SHR+L* - позитивна контролна група (10 mg/kg на дан лосартан), *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200* - групе које су примале *UE* у дози од 10, 50 и 200 mg/kg на дан, редом (\*\*  $p < 0,01$  и \*\*\*  $p < 0,001$  у поређењу са *SHRC*, ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  у поређењу са *SHR+L*, †††  $p < 0,001$  у поређењу са *SHR+UE50* и \$  $p < 0,05$  и \$\$\$  $p < 0,001$  у поређењу са *SHR+UE200*).....108

---

## Садржај табела

Табела 1.1. Табеларни приказ параметара и метода екстракција активних једињења из биљке <i>Urtica dioica</i> L.....	38
Табела 1.1. (Наставак).....	39
Табела 1.1. (Наставак).....	40
Табела 3.1. Стварне и кодиране вредности независних фактора (трајања екстракције и % <i>MeOH</i> ) коришћених у експерименталном дизајну.....	56
Табела 4.1. Садржај укупних фенола ( <i>TP</i> ), хлорогенске, 2- <i>O</i> -кафеоил малне киселине и рутина, као и антиоксидативни капацитети ( <i>DPPH</i> ) 50, 75 и 100%-тног <i>MeOH</i> , 50, 75 и 96%-тног <i>EtOH</i> и воденог екстракта листа коприве припремљених мацерацијама у трајању од 30 min.....	77
Табела 4.2. Кодиране вредности фактора-процент метанола у екстракционом средству ( $X_1$ ) и трајање екстракције ( $X_2$ ), експериментално добијени садржај <i>TP</i> и предвиђени садржај <i>TP</i> .....	80
Табела 4.3. Регресиони коефицијенти и тест значајности за полиномијалну једначину другог реда коришћену за моделовање зависности садржаја <i>TP</i> од % <i>MeOH</i> и трајања екстракције.....	81
Табела 4.4. Садржај укупних фенола ( <i>TP</i> ), хлорогенске, 2- <i>O</i> -кафеоил малне киселине и рутина у 54% <i>MeOH</i> екстрактима листа коприве припремљеним мацерацијом и ултразвучном екстракцијом ( <i>UAE</i> ) при различитим трајањима екстракције.....	86
Табела 4.5. Антиоксидативна активност мерена <i>DPPH</i> , <i>TEAC</i> и <i>FRAP</i> методама у 54% <i>MeOH</i> екстрактима листа коприве припремљеним мацерацијом и	

---

ултразвучном екстракцијом (UAE) при различитим трајањима екстракције.....87

**Табела 4.6.** Антиоксидативна активност (*FRAP* и *TEAC*), способност неутралисања супероксидног радикала, способност хелирања јона гвожђа и садржај нитрита у *UE*.....89

**Табела 4.7.** Биохемијски параметри у плазми и урину експерименталних животиња *SHR* – спонтано хипертензивни пацови, *SHRC* - контролна група, *SHR+L* - позитивна контролна група (10 mg/kg на дан лосартан), *SHR+UE10*, *SHR+UE50* и *SHR+UE200* - групе које су примале *UE* у дози од 10, 50 и 200 mg/kg на дан, редом (\*  $p < 0,05$  у поређењу са *SHRC*).....106

---

## Списак скраћеница

ABTS, енгл. *2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)*

ALT, енгл. *alanine transaminase*

ANOVA, енгл. *analysis of variance*

ASE, енгл. *accelerated solvent extraction*

AST, енгл. *aspartate aminotransferase*

ATP, енгл. *adenosine triphosphate*

bFGF, енгл. *basic fibroblast growth factor*

BIL-T, билирубин укупни

BH<sub>4</sub>, тетрахидробиптерина

BHA, енгл. *butylated hydroxyanisole*

BHT, енгл. *butylated hydroxytoluene*

C<sub>Cr</sub>, клиренс креатинина

C<sub>U</sub>, клиренс урее

cAMP, енгл. *cyclic adenosine monophosphate*

CAT, енгл. *catalase*

cGMP, енгл. *cyclic guanosine monophosphate*

COX, енгл. *cyclooxygenase*

DRPH, енгл. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*

EDHF, енгл. *endothelium-derived hyperpolarizing factors*

EDTA, енгл. *ethylenediaminetetraacetic acid*

ELISA, енгл. *enzyme-linked immunosorbent assay*

eNOS, енгл. *endothelial nitric oxide synthase*

ET-1, енгл. *endothelin 1*

---

*EtOH*, етанол

*FRAP*, енгл. *ferric reducing antioxidant power*

*GLDH* енгл. *glutamate dehydrogenase*

*GR*, енгл. *glutathione reductase*

*GSH*, редуковани глутатион

*GSH-Px*, енгл. *glutathione peroxidase*

*GSSG*, оксидовани глутатион

*GTP*, енгл. *guanosine triphosphate*

*HDL*, енгл. *high density lipoprotein*

*HHPE*, енгл. *high hydrostatic pressure extraction*

*HPLC/DAD*, енгл. *high-performance liquid chromatography/diode array detector*

*HPLC/UV-Vis*, енгл. *high-performance liquid chromatography/ultraviolet-visible spectrophotometry*

*HUVEC*, енгл. *human umbilical vein endothelial cells*

*iNOS*, енгл. *inducible nitric oxide synthase*

*IP3*, инозитол трифосфата

*IRAE*, енгл. *infrared-assisted extraction*

*LDH*, енгл. *lactate dehydrogenase*

*LDL*, енгл. *low density lipoprotein*

*LSD*, енгл. *least significant difference*

*MAE*, енгл. *microwave-assisted extraction*

*MeOH*, метанол

*NADH*, енгл. *nicotinamide adenine dinucleotide*

*NADPH*, енгл. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

*NBT*, енгл. *nitroblue tetrazolium*

*nNOS*, енгл. *neural nitric oxide synthase*

---

NO, азот моноксид

NOS, енгл. *nitric oxide synthase*

NO<sub>x</sub>, укупни нитрати и нитрити

PGI<sub>2</sub>, простациклин

PPAR, енгл. *peroxisome proliferator-activated receptor*

R<sup>2</sup>, коефицијент детерминације

RSM, енгл. *response surface methodology*

RSP, енгл. *response surface plot*

SFE, енгл. *supercritical fluid extraction*

SHR, енгл. *spontaneously hypertensive rat*

SHRC, контролна група која је гаважом примала 0,5 mL воде на дан

SHR+L, група која је примала лосартан у дози од 10 mg/kg на дан

SHR+UE10, група која је примала UE у дози од 10 mg/kg на дан

SHR+UE50, група која је примала UE у дози од 50 mg/kg на дан

SHR+UE200, група која је примала UE у дози од 200 mg/kg на дан

SOD, енгл. *superoxide dismutase*

SWE, енгл. *subcritical water extraction*

TBARS, енгл. *thiobarbituric acid reactive substances*

TEAC, енгл. *trolox equivalent antioxidant capacity*

TP, енгл. *total phenolic*

TPTZ, енгл. *2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine*

TRIS, енгл. *tris(hydroxymethyl)aminomethane*

UAE, енгл. *ultrasound assisted extraction*

UE, сув екстракт листа коприве

UIBC, неасићени капацитет везивања гвожђа

XO, енгл. *xanthine oxidase*

***прилози***



---

## Биографија

Кандидат Уна-Јована (Владимир) Вајић, дипломирани инжењер технологије, рођена је 10.06.1986. године у Грачаници, Босна и Херцеговина. Основну школу је завршила у Београду, након чега је уписала Математичку гимназију у којој је матурирала 2005. године. Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду уписала је школске 2005/2006. године, на којем је дипломирала 2010. године са просечном оценом 8,56. Школске 2011/2012. године уписала је докторске студије на Технолошко-металуршком факултету у Београду на смеру Биохемијско инжењерство и биотехнологија, под руководством др Бранка Бугарског, редовног професора. На докторским студијама је успешно положила све испите предвиђене планом и програмом са просечном оценом 9,82, а завршни испит под насловом „Припрема, карактеризација хемијског састава екстракта коприве и испитивање његовог дејства у условима експерименталне хипертензије“ је одбранила са оценом 10.

Од 2011. године запослена је као истраживач-приправник на Институту за медицинска истраживања, Универзитета у Београду на пројекту „Испитивање антихипертензивног и ренопротективног потенцијала супстанци природног и синтетског порекла у експерименталним моделима кардиоваскуларних и бубрежних обољења (ОИ 175096)“ у оквиру Групе за кардиоваскуларну физиологију. Током овог периода је учествовала у изради већег броја мастер радова, такође била је учесник реализације пројекта пословно-техничке сарадање са Друштовом за производњу, промет и услуге ФИП КОМЕРЦ Д.О.О. под називом „Реализација сета експерименталних студија примене уређаја Витафон-Т на пацовима соја *Wistar* и пацовима са урођеном хипертензијом”. У звање истраживач сарадник изабрана је 2014., а реизабрана 2017. год.

---

Уна-Јована Вајић је до сада била аутор или коаутор 13 радова штампаних у целини и то: десет (11) радова у међународним часописима (M20) од којих три (3) рада публикована у међународним часописима изузетних вредности (M21a), четири (4) рада у врхунским међународним часописима (M21), три (3) рада публикована у истакнутим међународним часописима (M22) један (1) рад публикован у међународном часопису (M23), један (1) рад у водећем часопису од националног значаја (M51), један (1) рад у часопису од националног значаја (M52). Објавила је и двадесет три (23) рада штампана у изводу на домаћим и међународним скуповима, од чега деветнаест (19) радова на међународним скуповима (M34) и четири (4) рада на скупу националног значаја (M64).

## Изјава о ауторству

Потписани-а Уна-Јована В. Вајић

Број индекса 4043/2011

### Изјављујем

Да је докторска дисертација под насловом:

„Оптимизација екстракције и карактеризација екстракта листа *Urtica dioica* L.  
за потребе испитивања дозно-зависног одговора у експерименталној  
хипертензији“

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

Потпис докторанда

У Београду, 7.6.2018.



**Изајва о истоветности штампане и електронске верзије  
докторског рада**

Потписани/а **Уна-Јована В. Вајић**

Број индекса **4043/2011**

Студијски програм: **Биохемијско инжењерство и биотехнологија**

Наслов рада: „**Оптимизација екстракције и карактеризација екстракта листа *Urtica dioica* L. за потребе испитивања дозно-зависног одговора у експерименталној хипертензији**“

Ментор: **др Бранко Бугарски**, редовни професор Универзитета у Београду,  
Технолошко-метеалуршки факултет

Потписани/а **Уна-Јована В. Вајић**

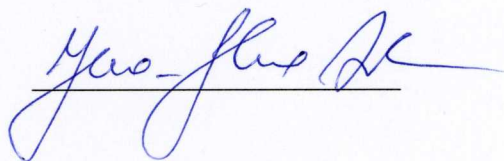
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју са предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 7.6.2018.



## Изјава о коришћењу

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

**„Оптимизација екстракције и карактеризација екстракта листа *Urtica dioica* L. за потребе испитивања дозно-зависног одговора у експерименталној хипертензији“**

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 7.6.2018,

