



UNIVERZITET U
NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI
FAKULTET

Department za hemiju, biohemiju
i zaštitu životne sredine



**MODULATORI METABOLIZMA
ARAHIDONSKE KISELINE U
PROCESU INFLAMACIJE: UTICAJ
ODABRANIH POLIFENOLA NA
PRODUKCIJU PROSTAGLANDINA
E₂ I TROMBOKSANA A₂**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:
Prof. dr Ivana Beara

Kandidat:
Tatjana Majkić

Novi Sad, 2021. godine

Mojoj mami, za beskrajnu ljubav i podršku

Eksperimentalni deo ovog rada urađen je u laboratorijama Katedre za biohemiju i hemiju prirodnih proizvoda, na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu u okviru realizacije projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja br. 172058. Kvantitativno određivanje polifenolnog profila uzoraka vina urađeno je na Institutu za javno zdravlje Vojvodine u saradnji sa dr Ljiljom Torović, redovnim profesorom Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu.

Želela bih da iskoristim priliku da se zahvalim svima koji su dali svoj doprinos izradi ove disertacije.

Na prvom mestu zahvaljujem se mojoj mentorki, profesorki dr Ivani Beara, na ukazanom poverenju i pruženoj prilici da se bavim istraživačkim radom. Hvala na sjajnim idejama, entuzijazmu, upornosti i istrajnosti da sprovedemo sve eksperimente prikazane u okviru ove teze, strpljenju za mnogobrojne diskusije i pregršt smernica tokom izrade eksperimentalnog rada i pisanja. Zahvalna sam joj na prenesenom znanju, velikim i malim savetima, kako o nauci i pedagoškom radu, tako i o životu.

Profesorki dr Nedi Mimici-Dukić zahvalna sam što me je upoznala sa biohemijom prirodnih proizvoda i lekovitog bilja, na svemu što me je naučila tokom studentskih dana, na interesovanju i na svim sugestijama tokom izrade ove disertacije.

Profesorki dr Ljilji Torović, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta, iskazujem zahvalnost za analizu hemijskog profila Merlot vina, interesovanju za tok eksperimenata i prikazane rezultate. Pre svega, hvala joj na optimizmu kojim zrači i pravim savetima koje sam od nje dobila.

Dr Dragani Četojević-Simin, naučnom savetniku Instituta za onkologiju Vojvodine, hvala na svesrdnoj pomoći tokom naših prvih koraka u laboratoriji za ćelijske kulture, na interesovanju za rezultate ovog rada i sugestije tokom pisanja.

Vanrednom profesoru, dr Mariji Lesjak, zahvalna sam na svemu što sam naučila od nje tokom prethodnih godina, na vedrom duhu i energiji koju unosi u laboratoriju, na interesovanju koje je pokazala za rezultate ove teze, kao i svim sugestijama koje su doprinele poboljšanju njenog kvaliteta.

Mast. Kristini Bekvalac, stručnom saradniku za hromatografske analize, hvala na velikoj pomoći prilikom izvođenja hromatografskih analiza, na njenom strpljenju, optimizmu i podršci. Takođe, dr Dejanu Orčiću, vanrednom profesoru, i mast. Sanji Berežni hvala na pomoći i podršci. Vanrednom profesoru dr Nataši Simin, osim za važne životne savete, iskazujem zahvalnosti i zbog pomoći prilikom nabavke potrebnih hemikalija i materijala. Profesoru dr Goranu Anačkov, dr Borisu Radak, dr Bojani Bokić, mast. Ivani Nemeš i mast. Milici Rat hvala na pomoći prilikom prikupljanja i determinacije biljnog materijala. Kolegama sa Katedre za fiziologiju životinja hvala na

svim međulaboratorijskim pozajmnicama. Dr Bojani Stanić, naučnom saradniku, zahvalna sam za dragocene savete o radu sa ćelijskim kulturama.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Jeleni Nađpal koja me je uvela u svet nauke, za savete, interesovanje i podršku tokom izrade disertacije.

Dr Zorici Mrkonjić, dr Filipu Šibul, dr Marini Francišković, dr Mileni Rašeta, dr Sanji Krstić, dr Sofiji Bekić i Jasmini Erdei-Popović hvala na podršci i prijatnim trenucima na poslu. Mast. Diandri Pintać, doc. dr Emiliji Svirčev i mast. Ivani Nemeš, sa kojima sam najviše delila vreme i laboratorije, zahvaljujem se za druženje koje je u pojedinim momentima tokom izrade ovog rada bilo posebno dragoceno. Svim zaposlenim na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine hvala na kolegijalnosti, pomoći i podršci.

Za iskreno prijateljstvo začeto tokom studentskih dana, veliki podstrek tokom svih faza izrade ove disertacije i sjajnu atmosferu tokom zajedničkog rad zahvalna sam dr Mileni Vujanović, sa Tehnološkog fakulteta, kao i mast. Slađani Kekezović, koja uvek zna da kaže prave reči, posebno na podršci tokom pisanja i pomoći oko rešavanja tehničkih nedoumica.

Od srca se zahvaljujem svim svojim prijateljima na iskrenoj podršci, razumevanju i lepim trenucima opuštanja. Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, mami, tati i Maji, za strpljenje, razumevanje i ljubav koju mi pružaju.

Hvala!

Tatjana Majkić

Skraćenice

12-HHT	12-hidroksi-5,8,10-heptadekatrienska kiselina
15d-PGJ2	15-deoksi-prostaglandin J ₂
15-PDGH	15-hidroksiprostaglandin dehidrogenaza
3 (sintetsko jedinjenje)	metil 3-(benzilamino)-4,4,4-trifluoro-2-fenilbutanoat
AC	adenil ciklaza
AdPLA ₂	fosfolipaza A ₂ specifična za adipocite
AP-1	aktivirajući protein-1 (<i>activating protein 1</i>)
ARE	AU-bogate sekvence (<i>adenylate-uridylate-rich elements</i>)
BSA	albumin goveđeg seruma
C/EBP	transkripcioni faktor <i>CCAAT-enhancer-binding proteins</i>
cAMP	ciklični adenzin monofosfat
cDNK	komplementarna deoksiribonukleinska kiselina
cGMP	ciklični guanozin monofosfat
COX	ciklooksigenaza (prostaglandin H sintaza, PGHS)
cPGES	citosolna PGE sintaza
cPLA ₂	citosolna fosfolipaze A ₂
CRE	element osetljiv na cAMP (<i>cAMP-response element</i>)
CYP450	citohrom P450 epoksigenaza
DAG	diacilglicerol
DEPC	dietil pirokarbonat
DHA	dokozaheksaenska kiselina
DMSO	dimetil-sulfoksid
DNasa	deoksiribonukleaza
EIA	enzimska imuno metoda
ELAM-1	adhezioni molekul leukocita i endotelijuma-1 (<i>endothelial leukocyte adhesion molecule-1</i>)
EP1-4	receptori za prostaglandin E ₂ podtipa 1-4 (<i>E prostanoid receptor subtype 1-4</i>)
EPA	eikozapentaenska kiselina
ERK	protein kinaza regulisana vanćelijskim signalima (<i>extracellular-signal regulated kinase</i>)
ESI	elektrosprej jonski izvor (<i>Electrospray ionization</i>)
FBS	fetalni goveđi serum (<i>fetal bovine serum</i>)
FC	Folin-Ciocalteu reagens
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza
GKE	ekvivalenti galne kiseline
GPCR	transmembranski receptori kuplovani sa G proteinima (<i>G protein-coupled receptors</i>)
GRE	elementi osetljive na glukokortikoide (<i>glucocorticoid response element</i>)
HDL	lipoproteini velike gustine (<i>high-density lipoproteins</i>)
HEPES	4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etanesulfonska kiselina
HETE	hidroksieikozatetraenska kiselina
HPLC	tačna hromatografija visokih performansi
IFN γ	interferon γ
IL	interleukin
IP	receptor za prostaglandin I ₂ (<i>I prostanoid receptor</i>)
iPLA ₂	Ca ²⁺ nezavisne fosfolipaze A ₂
IRAK	kinaza povezana sa IL-1 receptorom (<i>IL-1 receptor-associated kinase</i>)
JNK 1/2/3	protein kinaza c- <i>Jun amino-terminal kinase</i>
KE	ekvivalenti katehina
KvE	ekvivalenti kvercetina
LDL	lipoproteini male gustine (<i>low density lipoproteins</i>)
LOX	lipooksigenaza
LPLA ₂	lizosomalna fosfolipaza A ₂
LPS	lipopolisaharid
LT	leukotrien
LTB ₄	leukotrien B ₄
M-1 do M-12	<i>Merlot</i> vina iz Srbije
MAPK	mitogenom aktivirana protein kinaza (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MAPKK	kinaza MAPK
MDA	malonildialdehid
MFR	<i>Merlot</i> vino iz Francuske
MIT	<i>Merlot</i> vino iz Italije
MMA	<i>Merlot</i> vino iz Makedonije
mPGES-1	membranska PGE sintaza-1
mPGES-2	membranska PGE sintaza-2

MRM	mod za praćenje višestruke reakcije (<i>multiple reactions monitoring</i>)
mRNK	informaciona ribonukleinska kiselina
MSL	<i>Merlot</i> vino iz Slovenije
MSP	<i>Merlot</i> vino iz Španije
MyD88	faktor mijeloidne diferencijacije 88
NAD ⁺	nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	nikotinamid adenindinukleotid fosfat
Nd	nije detektovano
NF-E2	nuklearni faktor <i>nuclear factor-erytroid 2</i>
NF-κB	nuklearni faktor κB (<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells-nuclear factor kappa B</i>),
NSAIL (NSAID)	nesteroidni anti-inflamatorni lekovi (<i>non-steroidal anti-inflammatory drug</i>)
PAF	faktor agregacije trombocita (<i>platelet activating factor</i>)
PAF-PLA ₂	acilhidrolaze faktora agregacije trombocita
PALM	<i>P. altissima</i> metanolni ekstrakt
PALV	<i>P. altissima</i> vodeni ekstrakt
PARM	<i>P. argentea</i> metanolni ekstrakt
PARV	<i>P. argentea</i> vodeni ekstrakt
PCA	analiza glavnih komponenti (<i>Principal Component Analysis</i>)
PCR	lančana reakcija polimeraze (<i>polymerase chain reactioon</i>)
PGD ₂	prostaglandin D ₂
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PGES	prostaglandin E sintaza
PGF ₂ α	prostaglandin F ₂ α
PGG ₂	prostaglandin G ₂
PGH ₂	prostaglandin H ₂
PGI ₂	prostaglandin I ₂ (prostaciklin)
PHOM	<i>P. holesteum</i> metanolni ekstrakt
PHOV	<i>P. holesteum</i> vodeni ekstrakt
PKC	protein kinaza C
PL	fosfolipaza
PLA ₂	fosfolipaza A ₂
PLAM	<i>P. lanceolata</i> metanolni ekstrakt
PLAV	<i>P. lanceolata</i> vodeni ekstrakt
PLC	fosfolipaza C
PLD	fosfolipaza D
PMA	forbol-12-miristat-13-acetat
PMAM	<i>P. major</i> metanolni ekstrakt
PMAV	<i>P. major</i> vodeni ekstrakt
PMEM	<i>P. media</i> metanolni ekstrakt
PMEV	<i>P. media</i> vodeni ekstrakt
PVPP	polivinilpolipirolidon
RIA	radio-imuna metoda
RNK	ribonukleinska kiselina
RPMI-1640	medijum za ćelijske kulture <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-qPCR	kvantitativna reakcija lančane polimeraze u stvarnom vremenu
SD	standardna devijacija
s.e.	suvi ekstrakt
Sp1	specifičan protein 1 (<i>specificity protein 1</i>)
sPLA ₂	sekretorna fosfolipaza A ₂
TAK-1	kinaza aktivirana TGFβ (<i>transforming growth factor β-activated kinase</i>)
TBA	tiobarbiturna kiselina
TGFα	faktor nekroze tumora α
TGFβ	transformišući faktor rasta β
TLR4	receptor <i>toll-like receptor 4</i>
TP	receptor za tromboksan (<i>thromboxane prostanoid receptor</i>)
<i>trans-1</i> (sintetsko jedinjenje)	1-benzil-3-metil-4-(trifluorometil)azetidin-2-on
<i>trans-2</i> (sintetsko jedinjenje)	1-benzil-3-fenil-4-(trifluorometil)azetidin-2-on
<i>trans-4</i> (sintetsko jedinjenje)	metil trans-1-benzil-5-(trifluorometil)-4,5-dihidro-1H-imidazol-4-karboksilat
TXA ₂	tromboksan A ₂
TXAS	tromboksan A sintaza
TXB ₂	tromboksan B ₂
UPLC-MS/MS	tečna hromatografija ultra visokih performansi kombinovana sa tandemskom masenom spektrometrijom (<i>Ultra-high performance liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry</i>)
VCAM-1	adhezioni molekula vaskularnih ćelija 1 (<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>)
WHO	Svetska zdravstvena organizacija (<i>World Health Organization</i>)

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ОБРАЗАЦ – 5а
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА¹

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Татјана Мајкић
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	Др Ивана Беара, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду
Наслов рада:	Модулатори метаболизма арахидонске киселине у процесу инфламације: утицај одабраних полифенола на продукцију простагландина Е ₂ и тромбоксана А ₂
Језик публикације (писмо):	Српски (латиница)
Физички опис рада:	Унети број: Страница: 386 (129 у Додатном материјалу на ЦД-у) Поглавља: 9 (1 у Додатном материјалу на ЦД-у) Референци: 423 Табела: 181 (143 у Додатном материјалу на ЦД-у) Слика: 45 (26 у Додатном материјалу на ЦД-у) Графикона: 47 (47 у Додатном материјалу на ЦД-у) Хистограма 39 Прилога: 1 (1 у Додатном материјалу на ЦД-у)
Научна област:	Хемија
Ужа научна област (научна дисциплина):	Биохемија
Кључне речи / предметна одредница:	Простагландин Е ₂ , тромбоксан А ₂ , инфламација, полифеноли, боквице (<i>Plantago L.</i>), <i>Merlo</i> вина
Резиме на језику рада:	Инфламација представља имуни одговор организма на повреду и резултује опоравком организма. Уколико се наруши механизам имуног одговора, инфламација постаје хронична, а као таква, доприноси патогензи неких од најтежих болести данашњице. Услед недовољне активности и/или контраиндикација постојећих анти-инфламаторних лекова, интензивно се трага за новим терапеутицима, а природни производи представљају једне од потенцијалних, безбедних анти-инфламаторних агенаса. Са друге стране, еикозаноиди, производи метаболизма арахидонске киселине, имају важну улогу у физиолошким и патофизиолошким процесима, а нарочито у инфламацији. У фокусу ових истраживања, била су два еикозаноида: простагландин Е ₂ и тромбоксан А ₂ , једни од најважнијих производа циклооксигеназног пута метаболизма арахидонске киселине. Наиме, испитиван је потенцијал полифенолних једињења, екстраката боквица и узорака <i>Merlo</i> вина (као богатих извора полифенола) да инхибирају продукцију простагландина Е ₂ и тромбоксана А ₂ у процесу инфламације, као и утицај испитиваних узорака на експресију mRNK ензима који су укључени у синтезу

¹ Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

5в – Изјава о истовестности штампане и електронске верзије и о личним подацима;

5г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штампаном и електронском облику и не кориче се са тезом.

	<p>простагландина E₂ и тромбосана A₂. Као модел ситем коришћена је континуална ћелијска линија хуманих моноцита и макрофага (U937). Добијени резултати показују да модулација циклооксигеназног пута метаболизма арахидонске киселине може да буде један од механизма анти-инфламаторног деловања боквица и вина. Током хомеостазе, лутеолин и лутеолин-7-О-глукуронид су били најпотентнији инхибитори продукције простагландина E₂ и тромбосана A₂. У раним фазама инфламаторног процеса, као најбољи инхибитор продукције простагландина E₂ издвојио се птеростилбен, док су гална и урсолна киселина, апигенин, лутеолин-7-О-глукозид и резвератрол највише инхибирани синтезу тромбосана A₂. Такође, полифенолна једињења могу да модулирају метаболизам арахидонске киселине и на нивоу експресије mRNK ензима укључених у синтезу простагландина E₂ и тромбосана A₂. У модел систему касније фазе инфламаторног одговора, фенолне киселине најбоље инхибирају продукцију простагландина E₂, а резвератрол, гална и кафена киселина тромбосана A₂. Различити нивои и механизми активности испитаних полифенола указују на потребу за даљим испитивањима потенцијалног синергистичког деловања полифенола у циљу повећања ефикасности инхибиције продукције простагландина E₂ и тромбосана A₂ у процесима инфламације.</p>
<p>Датум прихватања теме од стране надлежног већа:</p>	<p>14.9.2017.</p>
<p>Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)</p>	
<p>Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)</p>	<p>Председник: др Неда Мимица Дукић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду Члан (ментор): др Ивана Беара, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду Члан: др Љиља Торовић, редовни професор, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду Члан: др Драгана Четојевић-Симин, научни саветник, Институт за онкологију Војводине, Сремска Каменица Члан: др Марија Лесјак, ванредни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду</p>
<p>Напомена:</p>	

KEY WORD DOCUMENTATION²

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Tatjana Majkić
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Professor Ivana Beara, PhD, Faculty of Sciences, University of Novi Sad
Thesis title:	Modulators of arachidonic acid metabolism in inflammation: effect of polyphenols on prostaglandin E ₂ and thromboxane A ₂ production
Language of text (script):	Serbian language (latin script)
Physical description:	Number of: Pages: 386 (129 in Supplementary data on CD) Chapters 9 (1 in Supplementary data on CD) References 423 Tables 181 (143 in Supplementary data on CD) Illustrations: 45 (26 in Supplementary data on CD) Figures: 47 (47 in Supplementary data on CD) Graphs 39 Appendices: 1 (1 in Supplementary data on CD)
Scientific field:	Chemistry
Scientific subfield (scientific discipline):	Biochemistry
Subject, Key words:	Inflammation, arachidonic acid, prostaglandin E ₂ , thromboxane A ₂ , polyphenols, plantains (<i>Plantago</i> L.), <i>Merlot</i> wine
Abstract in English language:	Inflammation is immune response to damage, which results in the recovery of organism. If the mechanism of immune response is dysregulated, inflammation becomes chronic. Chronic inflammation is involved in some of the most severe diseases of the modern age. Numerous anti-inflammatory drugs are currently approved, but due to their low activity or contraindications an intensive research on new drugs is ongoing, and natural compounds are one of the possible, safe anti-inflammatory agents. On the other hand, eicosanoids, products of arachidonic acid metabolism, have an important role in physiological and pathophysiological processes, particularly inflammation. In the focus of this study were prostaglandin E ₂ (PGE ₂) and thromboxane A ₂ (TXA ₂), one of the most important products of the cyclooxygenase pathway of arachidonic acid metabolism. Namely, the potential of polyphenols, as well as <i>Plantago</i> extracts and <i>Merlot</i> wine (a rich sources of polyphenols), to inhibit the production of PGE ₂ and TXA ₂ in inflammation processes was investigated, followed by determination of their effect on expression of mRNA of the enzymes involved in synthesis of PGE ₂ and TXA ₂ . <i>In vitro</i> model system, U937 monocytes and macrophages were used. Obtained results showed that modulation of cyclooxygenase pathway of arachidonic acid metabolism could be one of the mechanism of anti-inflammatory action of <i>Plantago</i> species and

² The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

56 – Statement on the authority,

5B – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

	<p>wine. During homeostasis, luteolin and luteolin-7-<i>O</i>-glucuronide were the most potent inhibitors of PGE₂ and TXA₂ production. During the initial phase of inflammation, pterostilbene showed the best potential in reduction of PGE₂ production, while apigenin, luteolin-7-<i>O</i>-glucoside, resveratrol, gallic and ursolic acid were the most powerful inhibitors of TXA₂ synthesis. Moreover, polyphenols modulate arachidonic acid metabolism at the mRNA expression level related to enzymes involved in the production of PGE₂ and TXA₂. In the late phase of inflammation, PGE₂ production was greatly suppressed by phenolic acids, while resveratrol, gallic, and caffeic acid were the best modulators of TXA₂ production. Polyphenols could exert influence on PGE₂ and TXA₂ production on different levels and through different mechanisms. Therefore, in order to obtain more effective inhibitors of PGE₂ and TXA₂ production in inflammation, further studies on potential synergistic effect of polyphenols are necessary.</p>
Accepted on Scientific Board on:	14.09.2017.
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	<p>President: Professor Neda Mimica Dukić, PhD, Faculty of Sciences, University of Novi Sad Member (Supervisor): Professor Ivana Beara, PhD, Faculty of Sciences, University of Novi Sad Member: Professor Ljilja Torović, PhD, Faculty of Medicine, University of Novi Sad Member: Full Research Professor Dragana Četojević-Simin, PhD, Oncology Institute of Vojvodina, University of Novi Sad Member: Associate Professor Marija Lesjak, PhD, Faculty of Sciences, University of Novi Sad</p>
Note:	

Sadržaj:

1. Rezime	1
2. Summary	5
3. Uvod	9
4. Opšti deo	15
4.1. Uloga arahidonske kiseline u inflamaciji	17
4.2. Ciklooksigenazni (COX) put metabolizma arahidonske kiseline	19
4.3. Prostaglandin E ₂ (PGE ₂) i tromboksan A ₂ (TXA ₂): mehanizam delovanja i biološka funkcija	21
4.4. Enzimi uključeni u produkciju PGE ₂ i TXA ₂	23
4.4.1. Fosfolipaze (PL)	23
4.4.2. Ciklooksigenaza-1 (COX-1) i ciklooksigenaza-2 (COX-2)	27
4.4.3. Prostaglandin E sintaze (PGES)	31
4.4.4. Tromboksan A sintaza (TXAS)	32
4.5. Eksperimentalne metode za praćenje aktivnosti enzima uključenih u produkciju PGE ₂ i TXA ₂	34
4.5.1. Eksperimentalne metode za praćenje aktivnosti PLA ₂	35
4.5.2. Eksperimentalne metode za praćenje aktivnosti COX-1 i COX-2	36
4.5.3. Eksperimentalne metode za praćenje aktivnosti PGES	40
4.5.4. Eksperimentalne metode za praćenje aktivnosti TXAS	42
4.5.5. Odabrani model sistem - U937 monociti i makrofage	43
4.6. Inhibitori ciklooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline	47
4.6.1. Nesteroidni anti-inflamatorni lekovi (NSAIL) i sintetska jedinjenja kao inhibitori produkcije i delovanja PGE ₂ i TXA ₂	47
4.6.2. Polifenolna jedinjenja kao modulatori ekspresije i aktivnosti enzima uključenih u produkciju PGE ₂ i TXA ₂	52
4.6.2.1. Polifenolna jedinjenja kao modulatori ekspresije i aktivnosti PLA ₂	54
4.6.2.2. Polifenolna jedinjenja kao modulatori ekspresije i aktivnosti COX-1/2	56
4.6.2.3. Polifenolna jedinjenja kao modulatori ekspresije i aktivnosti mPGES-1	60
4.6.2.4. Polifenolna jedinjenja kao modulatori ekspresije i aktivnosti TXAS	60
4.7. Hemijski sastav i biološka aktivnost odabranih vrsta roda <i>Plantago</i> L. (bokvice)	62
4.8. Hemijski sastav i biološka aktivnost <i>Merlot</i> vina	69
5. Eksperimentalni deo	75
5.1. Reagensi i instrumenti korišćeni u eksperimentalnom radu	77
5.2. Priprema ispitivanih uzoraka	79
5.2.1. Priprema ekstrakata odabranih vrsta roda <i>Plantago</i> L. (bokvica)	79
5.2.1.1. Priprema metanolnih ekstrakata	79
5.2.1.2. Priprema vodenih ekstrakata (infuza)	80
5.2.2. Priprema uzoraka <i>Merlot</i> vina	81
5.3. Određivanje hemijskog sastava ispitivanih uzoraka	82
5.3.1. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola i tanina	82
5.3.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida	83
5.3.3. Određivanje sadržaja ukupnih monomernih antocijana	84

5.3.4. Određivanje hemijskog sastava ekstrakata odabranih vrsta bokvica primenom HPLC-MS/MS i HPLC-DAD tehnika	85
5.3.4.1. HPLC-MS/MS detekcija odabranih jedinjenja u ekstraktima bokvica.....	85
5.3.4.2. HPLC-DAD detekcija odabranih jedinjenja u ekstraktima bokvica.....	88
5.3.5. Određivanje polifenolnog profila <i>Merlot</i> vina primenom HPLC-UV/VIS tehnike	88
5.3.5.1. Određivanje sadržaja odabranih polifenolih jedinjenja u <i>Merlot</i> vinima	89
5.3.5.2. Određivanje sadržaja odabranih antocijana u <i>Merlot</i> vinima	89
5.4. Uticaj odabranih uzoraka na produkciju PGE ₂ i TXA ₂	90
5.4.1. Gajenje U937 ćelija (monocita)	90
5.4.2. Transformacija U937 monocita u makrofage	90
5.4.3. Ispitivanje citotoksičnosti	90
5.4.4. Određivanje uticaja na produkciju PGE ₂ i TXA ₂	92
5.4.4.1. Uticaj na produkciju PGE ₂ i TXA ₂ u nestimulisanim monocitima	92
5.4.4.2. Uticaj na produkciju PGE ₂ i TXA ₂ u LPS-stimulisanim monocitima	93
5.4.4.3. Uticaj na produkciju PGE ₂ i TXA ₂ u LPS-stimulisanim makrofagama	95
5.4.4.4. Ekstrakcija i kvantifikacija PGE ₂ i TXA ₂	96
5.4.5. Određivanje uticaja na ekspresiju mRNK odabranih enzima ciklooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline u U937 monocitima i makrofagama primenom RT-qPCR	97
5.4.5.1. Tretman LPS-stimulisanih U937 monocita	98
5.4.5.2. Tretman LPS-stimulisanih U937 makrofaga	99
5.4.5.3. Ekstrakcija ribonukleinskih kiselina (RNK).....	99
5.4.5.4. Određivanje koncentracije RNK.....	100
5.4.5.5. Tretman deoksiribonukleazom (Dnase I) i sinteza komplementarne DNK (cDNK)	101
5.4.5.6. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze (qPCR).....	102
5.5. Obrada podataka	104
6. <i>Rezultati i diskusija</i>	105
6.1. Optimizacija metode	112
6.2. Ispitivanje citotoksičnosti - odabir subtoksičnih koncentracija ispitivanih uzoraka	132
6.3. Metanolni i vodeni ekstrakti bokvica kao modulatori produkcije PGE ₂ i TXA ₂	137
6.3.1. Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i tanina u ekstraktima bokvica.....	137
6.3.2. Sadržaj odabranih jedinjenja u ekstraktima bokvica	140
6.3.3. Uticaj ekstrakata bokvica na produkciju PGE ₂ i TXA ₂	151
6.4. <i>Merlot</i> vina kao modulatori produkcije PGE ₂ i TXA ₂	168
6.4.1. Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida, tanina i antocijana u uzorcima <i>Merlot</i> vina	168
6.4.2. Sadržaj odabranih polifenolnih jedinjenja u uzorcima <i>Merlot</i> vina	172
6.4.3. Određivanje sadržaja odabranih antocijana u <i>Merlot</i> vinima	179
6.4.4. Uticaj <i>Merlot</i> vina na produkciju PGE ₂ i TXA ₂ u makrofagama	182
6.5. Odabrani polifenoli kao modulatori produkcije PGE ₂ i TXA ₂	189
6.5.1. Uticaj odabranih polifenola na produkciju PGE ₂ i TXA ₂ u monocitima.....	189

6.5.2. Uticaj odabranih polifenola na produkciju PGE ₂ i TXA ₂ u LPS-stimulisanim makrofagama.....	209
6.6. Upotreba optimizovane metode za ispitivanje anti-inflamatornog potencijala sintetskih jedinjenja	214
7. <i>Zaključak</i>	221
8. <i>Literatura</i>	233

1. Rezime

Eikozanoidi, proizvodi metabolizma arahidonske kiseline, imaju važnu ulogu u fiziološkim, ali i u patofiziološkim procesima, a naročito u inflamaciji. U fokusu naših istraživanja bili su prostaglandin E₂ (PGE₂) i tromboksan A₂ (TXA₂), jedni od najvažnijih proizvoda ciklooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline. Imajući u vidu važnost regulacije produkcije PGE₂ i TXA₂ u inflamatornim procesima i neophodnost pronalaženja novih, efikasnih i bezbednih anti-inflamatornih agenasa, kao što su na primer biološki aktivni prirodni proizvodi, u okviru ove doktorske disertacije je ispitivan potencijal sekundarnih metabolita biljaka - polifenolnih jedinjenja da inhibiraju produkciju PGE₂ i TXA₂ u *in vitro* modelima inflamacije.

In vitro model sistem sadržao je važne komponente imunog sistema - monocite ili makrofage (U937 ćelijska linija), a inflamacija je indukovana dejstvom lipopolisaharida (LPS). U eksperimentima su korišćene tri varijacije model sistema:

a) Model sistem sa nestimulisanim monocitima - praćenje uticaja ispitivanih uzoraka na produkciju PGE₂ i TXA₂ tokom homeostaze,

b) Model sistem sa LPS-stimulisanim monocitima - praćenje uticaja ispitivanih uzoraka na produkciju PGE₂ i TXA₂ tokom rane faze inflamatornog odgovora,

c) Model sistem sa LPS-stimulisanim makrofagama - praćenje uticaja ispitivanih uzoraka na produkciju PGE₂ i TXA₂ tokom kasnijih faza inflamatornog odgovora.

U ovom *in vitro* model-sistemu, HPLC-MS/MS tehnika je korišćena za praćenje uticaja ispitivanih uzoraka na nivo produkcije PGE₂ i TXA₂. U cilju proučavanja mehanizma delovanja, primenom RT-qPCR metode praćen je uticaj ispitivanih uzoraka na ekspresiju mRNK enzima uključenih u deo ciklooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline koji rezultuje sintezom PGE₂ i TXA₂, i obuhvata enzime prve faze: cPLA₂α (citosolna fosfolipaza A₂α) i COX-1/2 (ciklooksigenaza-1 i -2), kao i enzime terminalnih faza: tri PGES (prostaglandin E sintaza) i TXAS (tromboksan A sintaza).

Nakon optimizacije eksperimentalnih uslova, pored aktivnosti metanolnih i vodenih ekstrakata šest vrsta bokvica (*Plantago altissima* L., *P. argentea* Chaix 1785, *P. holersteum* Scop., *P. lanceolata* L. 1753, *P. major* L. 1753, *P. media* L. 1753) i 17 uzoraka *Merlot* vina (kao bogatih izvora polifenola), u ovim istraživanjima ispitana je i aktivnost standardnih polifenolnih jedinjenja (7 fenolnih kiselina, 8 flavonoida, 2 metabolita flavonoida, 2 stilbena, 1 dihidrohalkon), 1 iridoida, 1 triterpenske kiseline i 4 standardna inhibitora COX-1/2 enzima. Optimizovani sistem je primenjen i za praćenje anti-inflamatornog potencijala 4 sintetska jedinjenja.

Najvažniji zaključci i rezultati istraživanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije su:

- U937 monociti i makrofage predstavljaju pogodan *in vitro* biološki sistem za analizu uticaja različitih uzoraka na produkciju PGE₂ i TXA₂ u inflamaciji i mogu se koristiti kao relevantni sistem za primarni skrining anti-inflamatorne aktivnosti.

- Od šest ispitanih vrsta bokvica, *P. altissima* je ispoljila najbolju aktivnost pri inhibiciji produkcije PGE₂ i ekspresije COX-2 mRNA u početnim fazama inflamacije, te se može izdvojiti kao vrsta sa značajnim anti-inflamatornim potencijalom. Iako direktna korelacija između hemijskog sastava ekstrakata bokvica i uticaja na nivo produkcije PGE₂ i TXA₂ nije uočena, mnoga od detektovanih jedinjenja, kao što su na primer aukubin, akteozid, hlorogenska kiselina, apigenin i luteolin su poznata po izraženoj

biološkoj aktivnosti i blagotvornom dejstvu na zdravlje, te prikazani rezultati sugerišu na potrebu za daljim ispitivanjima biološke aktivnosti u cilju otkrivanja novih mehanizama delovanja ovih vrsta.

- *Merlot* vina ispoljavaju bolji potencijal inhibicije produkcije TXA₂ nego PGE₂, što verovatno doprinosi njihovom kardioprotektivnom delovanju („Francuski paradoks“). Prema dostupnim podacima, pretpostavlja se da je ovo prvo istraživanje u kom je je ispitan uticaj *Merlot* vina na produkciju PGE₂ u *in vitro* modelu inflamacije.

- Tokom homeostaze, najsnažniju inhibiciju produkcije PGE₂ i TXA₂ ispoljili su luteolin i luteolin-7-*O*-glukuronid.

- U početnim fazama inflamacije, pterostilben je najbolje inhibirao produkciju PGE₂, a najznačajniju inhibiciju produkcije TXA₂ postigli su galna kiselina, apigenin, luteolin-7-*O*-glukozid, rezveratrol, ursolna kiselina i aukubin. Polifenoli su modulirali ekspresiju mRNA enzima uključenih u produkciju PGE₂ i TXA₂. Luteolin, pterostilben i aukubin su inhibirali ekspresiju cPLA₂α mRNA, a najjači uticaj na redukciju ekspresije COX-2 mRNA imali su epikatehin, katehin, miricetin i luteolin. Većina jedinjenja koja su smanjila ekspresiju COX-2 mRNA, istovremeno su povećala ekspresiju mPGES-1 mRNA. Apigenin-7-*O*-glukozid, luteolin, aukubin i ursolna kiselina su snažno supresovali ekspresiju TXAS mRNA.

- U kasnijoj fazi inflamatornog odgovora, najsnažniju inhibiciju produkcije PGE₂ su izazvale fenolne kiseline (protokatehinska i galna kiselina), dok su rezveratrol, galna i kafena kiselina bili najbolji inhibitori produkcije TXA₂.

- Na osnovu prikazanih rezultata, uočava se da polifenolna jedinjenja moduliraju produkciju PGE₂ i TXA₂ različitim mehanizmima, što upućuje na potrebu za novim pravcem istraživanja: pronalaženje optimalnih kombinacija polifenola koji će delovanjem u različitim fazama metabolizma arahidonske kiseline efikasno inhibirati produkciju PGE₂ i TXA₂ u procesima inflamacije.

2. Summary

Eicosanoids, the products of arachidonic acid metabolism, have an important role in physiological and pathophysiological processes, particularly in inflammation. In the focus of our study were prostaglandin E₂ (PGE₂) and thromboxane A₂ (TXA₂), one of the most important products of the cyclooxygenase pathway of arachidonic acid metabolism. Having in mind the importance of regulation of PGE₂ and TXA₂ production in inflammation and need for new, safe anti-inflammatory agents, such as natural products, in this doctoral thesis the potential of plant secondary metabolites - polyphenols to reduce the production of PGE₂ and TXA₂ in *in vitro* model system of inflammation was examined.

In vitro model system included important constituents of immune system - monocytes or macrophages (U937 cell line), while inflammation was induced by lipopolysaccharide (LPS). Experiments were performed using three variations of the model system:

- a) Unstimulated monocytes - used to examine the ability of selected samples to modulate the production of PGE₂ and TXA₂ during homeostasis;
- b) LPS-stimulated monocytes - used to examine the ability of selected samples to modulate the production of PGE₂ and TXA₂ during the initial phase of inflammation;
- c) LPS-stimulated macrophages - used to examine the ability of selected samples to modulate the production of PGE₂ and TXA₂ during the late phase of inflammation.

HPLC-MS/MS technique was applied to evaluate the influence of analysed samples on PGE₂ and TXA₂ production. RT-qPCR was used to determine effect of examined samples on expression of mRNA related to the enzymes involved in the synthesis of PGE₂ and TXA₂ in the cyclooxygenase pathway of arachidonic acid metabolism: PLA₂ (phospholipase A₂), COX-1/2 (cyclooxygenase-1 and -2), three PGES (prostaglandin E synthase) and TXAS (thromboxane A₂ synthase).

Firstly, experimental protocol was optimised. Modulatory effect on the PGE₂ and TXA₂ production expressed by methanol and water extracts of six *Plantago* species (*Plantago altissima* L., *P. argentea* Chaix 1785, *P. holsteum* Scop., *P. lanceolata* L. 1753, *P. major* L. 1753, *P. media* L. 1753) and 17 samples of *Merlot* wine (as a rich sources of polyphenols), as well as standard polyphenolic compounds (7 phenolic acids, 8 flavonoids, 2 flavonoids metabolites, 2 stilbenes, 1 dihydrochalcone), 1 iridoid, 1 triterpenic acid and 4 COX inhibitors was determined. Optimised model-system was also used to examine anti-inflammatory potential of 4 synthetic compounds.

The most important conclusions and results of this this doctoral thesis are:

- U937 monocytes and macrophages are suitable *in vitro* biological system which can be used to evaluate effects of different samples on PGE₂ and TXA₂ production in inflammation processes and can be applied in primary screening of anti-inflammatory activity.

- Among six analysed *Plantago* species, *P. altissima* showed the highest activity regarding PGE₂ production and COX-2 mRNA expression during the initial phase of inflammation. Therefore, *P. altissima* could be regarded as a species with high anti-inflammatory potential. Although direct correlation between the chemical composition of *Plantago* extracts and the effect on the PGE₂ and TXA₂ production was not observed, many of the detected compounds, such as aucubin, acteoside, chlorogenic acid, apigenin and luteolin, are known as compounds with pronounced biological activity and with

proven health benefits. Therefore, the presented results suggest the need for further studies of biological activities in order to determine possible mechanisms of action of these species.

- The analyzed *Merlot* wines showed better inhibition of TXA₂ production compared to PGE₂, that possibly contributes to their cardioprotective effect („French paradox“). To the best of our knowledge, the influence of *Merlot* wine on PGE₂ production was examined for the first time in our study.

- During homeostasis, luteolin and luteolin-7-*O*-glucuronide were the best inhibitors of PGE₂ and TXA₂ production.

- During the initial phase of inflammation, pterostilbene showed the best potential to reduce PGE₂ production, while apigenin, luteolin-7-*O*-glucoside, resveratrol, gallic and ursolic acid greatly inhibited TXA₂ synthesis. Moreover, polyphenols modulated the expression of mRNA of enzymes involved in the production of PGE₂ and TXA₂. Luteolin, pterostilbene, and aucubin inhibited cPLA₂ α mRNA expression, and epicatechin, catechin, myricetin, and luteolin had the strongest effect on suppression of COX-2 mRNA. Most compounds that decreased COX-2 mRNA expression, simultaneously increased mPGES-1 mRNA expression. Apigenin-7-*O*-glucoside, luteolin, aucubin, and ursolic acid strongly suppressed TXAS mRNA expression.

- In the late phase of inflammation, phenolic acids (protocatechuic and gallic acid) were the best inhibitors of PGE₂ production, while resveratrol, gallic, and caffeic acid were the best modulators of TXA₂ production.

- Obtained results showed that polyphenols could effect PGE₂ and TXA₂ production on different levels and through different mechanisms. Therefore, there is a need for further studies in order to find the optimal combinations of polyphenols, acting synergistically and at different points of arachidonic acid metabolism that could be more effective in inhibition of PGE₂ and TXA₂ production in inflammation.

3. Uvod

Inflamacija (upala, zapaljenje) je imunološki proces koji predstavlja odbrambeni odgovor organizma na povredu tkiva izazvanu hemijskim, mikrobiološkim ili fizičkim agensima. Primarni cilj inflamatornog odgovora (akutna inflamacija) je uklanjanje patogena, reparacija oštećenog tkiva i memorisanje kontakta sa patogenom, kako bi pri narednom susretu organizam brže reagovao i pretrpeo manje oštećenja. Međutim, ukoliko dođe do narušavanja mehanizma regulacije ovog procesa, inflamacija postaje hronična. Hronični inflamatorni procesi imaju značajnu ulogu u patogenezi ateroskleroze, artritisa, dijabetesa, kancera, neurodegenerativnih i autoimunih oboljenja. Po podacima Svetske zdravstvene organizacije, mnoge od navedenih bolesti su među deset vodećih uzroka smrti u svetu (Stables i Gilroy, 2011; Koeberle i Werz, 2018; WHO, 2020).

Na tržištu je prisutan veliki broj lekova koji se koriste u tretmanu inflamatornih oboljenja. Međutim, zbog nedovoljne efikasnosti i/ili kontraindikacija koje se javljaju usled duže upotrebe ovih lekova, intenzivno se traga za novim agensima koji bi mogli da supresuju inflamaciju, a time i razvoj navedenih bolesti. Koeberle i Werz (2018) u svom radu navode: „*Some of the most used anti-inflammatory drugs were bioinspired*“ - razvoj nekih od najpoznatijih anti-inflamatornih lekova inspirisan je prirodnim proizvodima.

Prirodni proizvodi predstavljaju neiscrpan izvor za pronalazak potencijalnih anti-inflamatornih agenasa. Prednost prirodnih jedinjenja se ogleda u tome što su vekovima zastupljena u ishrani i etnomedicini brojnih naroda, usled čega postoje preliminarni podaci o potencijalnoj efikasnosti ili toksičnosti. Postoji veliki broj biljnih preparata čije su aktivne supstance i mehanizmi delovanja poznati, ali i onih koji su još uvek nedovoljno ispitani. Nakon što se utvrdi mehanizam delovanja i strukturne karakteristike jedinjenja odgovornih za aktivnost, otvara se mogućnost da se modifikacijama hemijske strukture poboljša biološki potencijal datih jedinjenja ili da se aktivna jedinjenja koja su u prirodi prisutna, ali je proces njihovog izolovanja i prečišćavanja dugotrajan, sintetišu u laboratoriji.

Jedan od najpoznatijih i najprodavanijih lekova na svetu je aspirin. Aspirin (acetilsalicilna kiselina) je derivat prirodnog proizvoda salicilne kiseline koja je jedna od aktivnih principa bele vrbe (*Salix alba* L.). Aspirin deluje kao inhibitor ciklooksigenaza, ključnih enzima uključenih u metabolizam arahidonske kiseline, polinezasićene masne kiseline koja je prekursor velikog broja signalnih lipidnih molekula - eikozanoida. Aspirin se, zbog svog protiv-upalnog delovanja, upotrebljava za ublažavanje bolova i snižavanje temperature, a sa druge strane niske doze aspirina deluju kardioprotektivno i preporučuju se za prevenciju tromboze, odnosno za takozvano „razblaživanje krvi“. Protivupalno delovanje aspirin ostvaruje inhibicijom produkcije prostaglandina E₂ (PGE₂), dok je kardioprotektivno delovanje prvenstveno posledica inhibicije produkcije tromboksana A₂ (TXA₂), koji spadaju među najvažnije eikozanoide, produkte ciklooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline. Tokom godina, ustanovljeno je da aspirin može da ima i druge blagotvorne efekte, kao što je antikancerogeno delovanje (Rouzer i Marnet, 2009; Ricciotti i FitzGerald, 2011; Crescente i sar., 2019).

Uopšteno, eikozanoidi nastaju u jednom od tri metabolička puta (epoksigenazni, ciklooksigenazni i lipooksigenazni) u kojima dolazi do transformacije arahidonske kiseline, koja se u organizam unosi direktno putem ishrane ili, indirektno, nastaje iz

esencijalne linolne kiseline, a iz ćelijske membrane se oslobađa pod dejstvom različitih fizičkih, hemijskih ili fizioloških stimulusa. Eikozanoidi koji nastaju u ciklooksigenaznom putu metabolizma arahidonske kiseline se zajedničkim imenom nazivaju prostanoidi, a ispoljavaju različita fiziološka dejstva, kako u homeostazi, tako i u patološkim stanjima (Curtis-Prior, 2004). Smatra se da je regulacija njihove produkcije značajan korak u sprečavanju inflamatornih procesa, a da inhibitori ciklooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline, kao na primer inhibitori produkcije PGE₂ i TXA₂ mogu da predstavljaju potentne anti-inflamatorne agense.

Stoga su definisane dve osnovne ideje ovih istraživanja:

1. *Mogućnost supresije inflamatornog procesa na nivou inhibicije produkcije PGE₂ i TXA₂*

PGE₂ je neophodan za pravilno funkcionisanje bubrega, reproduktivnog i gastrointestinalnog sistema. Nasuprot tome, PGE₂ je i jedan od najpoznatijih proinflamatornih medijatora koji je odgovoran za klasične znakove upale: otok, bol, crvenilo. Povećana produkcija PGE₂ doprinosi razvoju kancera, artritisa i kardiovaskularnih bolesti. Uopšteno, nivo produkcije i funkcija PGE₂ zavise od kompleksne mreže enzima uključenih u njegovu sintezu i degradaciju, kao i od prisustva čak četiri receptora preko kojih PGE₂ ispoljava svoje delovanje (Legler i sar., 2010; Ricciotti i FitzGerald, 2011).

TXA₂ je faktor agregacije trombocita, vaz- i bronhokonstriktor koji je neophodan za održavanje homeostaze organizma, prvenstveno kardiovaskularnog sistema. Sa druge strane, usled narušavanja regulatornih mehanizama organizma, dolazi do razvoja patoloških stanja u kojima učestvuje i TXA₂, kao što su na primer kardiovaskularna oboljenja, ateroskleroza, tromboza, gestacijska hipertenzija i preeklampsija, plućna hipertenzija, razvoj i progresija kancera. Uopšteno, u produkciji TXA₂ učestvuje nekoliko enzima, a dejstvom antagonista TP receptora, preko kojih TXA₂ ispoljava biološku funkciju, takođe mogu biti smanjeni neželjeni efekti povećane produkcije TXA₂ (Dogné i sar., 2006).

Imajući u vidu da smanjena produkcija PGE₂ i TXA₂ može da ima uticaj na supresiju inflamatornih procesa, a da prirodni proizvodi predstavljaju potentne, bezbedne, ali nedovoljno ispitane anti-inflamatorne agense, osnovni cilj ove doktorske disertacije je bilo ispitivanje potencijala sekundarnih metabolita biljaka iz klase polifenolnih jedinjenja da inhibiraju produkciju PGE₂ i TXA₂ u procesima inflamacije. Odabrani *in vitro* model sistem su činile važne komponente imunog sistema - monociti ili makrofage (U937 ćelijska linija), u kojima je inflamacija, a samim tim i povećana produkcija PGE₂ i TXA₂, izazvana dodatkom lipopolisaharida (LPS), bakterijskog endotoksina koji snažno inicira inflamatorni proces, a uticaj različitih standardnih jedinjenja (polifenola), kao i kompleksnih smeša polifenola (ekstrakti bokvica i uzorci *Merlot* vina) na smanjenje nivoa produkcije PGE₂ i TXA₂ je praćen primenom HPLC-MS/MS tehnike.

2. *Polifenoli kao potencijalni anti-inflamatorni agensi i modulatori metabolizma arahidonske kiseline*

Polifenolna jedinjenja su sekundarni biljni metaboliti i jedni od glavnih nosilaca biološkog potencijala biljaka. Obuhvataju četiri osnovne klase jedinjenja: fenolne

kiseline, lignane, stilbene i flavonoide. Poznato je da ishrana bogata namirnicama biljnog porekla koje sadrže polifenolna jedinjenja blagotvorno utiče na zdravlje. Kako se polifenolna jedinjenja u organizam retko unose pojedinačno, u ovom radu su, pored odabranih pojedinačnih standarda polifenola, kao bogati izvori ovih sekundarnih biomolekula korišćeni uzorci vina i ekstrakti bokvica. I vina i ekstrakti bokvica su poznati po blagotvornom delovanju na organizam i imaju dugu tradiciju upotrebe u ishrani i narodnoj medicini (WHO 1999; Guilford i Pezzuto, 2011; Haddadian i sar., 2014; Gonçalves i Romano, 2016; Pavlidou i sar., 2018; Ji i sar., 2019; Fragopoulou i Antonopoulou, 2020).

U složenoj kaskadi inflamatornih procesa koji uključuju metabolizam arahidonske kiseline, nakon inicijalne stimulacije i pokretanja signalnog puta, ekspresija enzima na transkripcionom nivou predstavlja prvu fazu gde može biti izvršena modulacija ovog metaboličkog puta. Iako su za mnoga polifenolna jedinjenja delimično poznati mehanizmi delovanja na metabolizam arahidonske kiseline (Sobhani i sar., 2020), uticaj polifenolnih jedinjenja na ekspresiju terminalnih enzima uključenih u produkciju PGE₂ i TXA₂ je bio predmet malog broja istraživanja. Zbog toga je jedan od ciljeva ove disertacije bilo i proučavanje mehanizma delovanja ispitivanih uzoraka na nivou regulacije ekspresije mRNK upravo ovih enzima.

Kao osnovni ciljevi istraživanja ove disertacije postavljeni su:

1. Određivanje optimalnih eksperimentalnih uslova za produkciju PGE₂ i TXA₂ u *in vitro* model sistemu - U937 monocitima i makrofagama;
2. Priprema i hemijska karakterizacija, prvenstveno usmerena na određivanje polifenolnog profila, metanolnih i vodenih ekstrakata šest vrsta bokvica (*P. altissima* L., *P. argentea* Chaix 1785, *P. holsteum* Scop., *P. lanceolata* L. 1753, *P. major* L. 1753, *P. media* L. 1753) i 17 uzoraka Merlot vina (12 vina iz Srbije i 5 iz Francuske, Italije, Makedonije, Slovenije i Španije) primenom hromatografskih (HPLC-MS/MS, HPLC-UV/VIS, HPLC-DAD) i spektrofotometrijskih metoda (UV/VIS);
3. Odabir subtoksičnih koncentracija i određivanje uticaja ekstrakata bokvica, uzoraka vina i odabranih prirodnih jedinjenja, prvenstveno polifenola, na produkciju PGE₂ i TXA₂ u nestimulisanim monocitima i monocitima i makrofagama u kojima je infamacija izazvana dodatkom LPS, primenom HPLC-MS/MS tehnike, i ekspresiju mRNK enzima koji su uključeni u sintezu PGE₂ i TXA₂ (cPLA₂α (citosolna fosfolipaza A₂α), COX-1/2 (ciklooksigenaza-1 i -2), tri PGES (prostaglandin E sintaze) i TXAS (tromboksan A sintaza) u monocitima ili makrofagama u kojima je inflamacija izazvana dodatkom LPS, primenom RT-qPCR;
4. Primena optimizovanog model sistema za ispitivanje anti-inflamatornog potencijala sintetskih jedinjenja praćenjem uticaja na produkciju PGE₂ i TXA₂ i ekspresiju cPLA₂α i COX-1/2 mRNK u makrofagama u kojima je inflamacija izazvana dodatkom LPS
5. Statistička obrada rezultata u cilju formiranja zaključak o anti-inflamatornom potencijalu ispitivanih standardnih jedinjenja, uzoraka vina i ekstrakata bokvica, odnosno njihovom uticaju na krajnji rezultat metabolizma arahidonske kiseline ciklooksigenaznim putem - produkciju PGE₂ i TXA₂, kao i mehanizam delovanja

ispitivanih standardnih jedinjenja, ekstrakata bokvica i uzoraka *Merlot* vina na genskom nivou.

Rezultati istraživanja urađenih u okviru ove doktorske disertacije su, do sada, verifikovani u 3 publikacije (Majkić i sar., 2019; Beara i sar., 2020; Majkić i sar., 2020).

4. Opšti deo

4.1. Uloga arahidonske kiseline u inflamaciji

Inflamacija (upala, zapaljenje) je imunološki proces koji predstavlja odbrambeni odgovor organizma na povredu tkiva izazvanu hemijskim, mikrobiološkim ili fizičkim agensima. Primarni cilj inflamatornog odgovora je uklanjanje patogena, reparacija oštećenog tkiva i memorisanje patogena, kako bi pri narednom susretu organizam brže reagovao i pretrpeo manje oštećenja. Inflamatorni odgovor je kompleksan, ali dobro koordinisan mehanizam koji obuhvata produkciju medijatora inflamacije (citokina, interleukina, eikozanoida) i aktivaciju ćelija zaduženih za inflamatorni odgovor (diferencijaciju, adheziju, migraciju i hemotaksu). Poslednja faza akutne inflamacije, osim uklanjanja egzogenog stimulusa, obuhvata i apoptozu ćelija koje su bile uključene u inflamatorni odgovor i potpuni povratak fizioloških funkcija tkiva. Međutim, usled narušavanja mehanizma regulacije ovog procesa, inflamacija postaje hronična. Hronični inflamatorni procesi imaju značajnu ulogu u patogenezi ateroskleroze, artritisa, dijabetesa, kancera, neurodegenerativnih i autoimunih oboljenja. Po podacima Svetske zdravstvene organizacije, mnoge od navedenih bolesti su među deset vodećih uzroka smrti u svetu (Stables i Gilroy, 2011; Koeberle i Werz, 2018; WHO, 2020).

Eikozanoidi, signalni lipidni molekuli, nastaju oksidacijom eikozatrienske kiseline (20:3), arahidonske kiseline (20:4) i eikozapentaenske kiseline (20:5, EPA), dok strukturno slična jedinjenja, dokozaonoidi, nastaju oksidacijom masnih kiselina koje imaju 22 ugljenikova atoma, kao što je dokozaheksaenska kiselina (22:6, DHA). Eikozanoidi učestvuju u inflamatornom odgovoru, gde mogu da ispoljavaju anti-inflamatorno ili proinflamatorno delovanje. Takođe, imaju esencijalnu ulogu u mnogim fiziološkim procesima organizma. Ova biološki aktivna jedinjenja upravljaju procesima u ćelijama tako što deluju preko nuklearnih receptora ili receptora kuplovanih sa G proteinom (GPCR, *G protein-coupled receptors*). Neophodni su za održavanje vaskularne homeostaze, kontrolu agregacije trombocita, reprodukciju, zaštitu gastrične mukoze, ali i regulaciju navedenih patoloških procesa povezanih sa hroničnom inflamacijom (Marks i Fürstenberg, 1999; Curtis-Prior, 2004; Harizi i sar., 2008; Koeberle i Werz, 2018).

Arahidonska kiselina (5,8,11,14-eikozatetraenska kiselina) je prekursor eikozanoida koji privlači najviše pažnje i čiji metabolizam je najviše proučen. To je polinezasićena masna kiselina koja se u organizam unosi direktno putem ishrane ili, indirektno, nastaje iz esencijalne linolne kiseline. Intracelularna koncentracija arahidonske kiseline je veoma niska, jer se ona uglavnom nalazi u esterifikovanom obliku u fosfolipidima koji izgrađuju membrane ćelija i ćelijskih organela. Usled delovanja različitih fizičkih, hemijskih ili fizioloških stimulusa, inicirano je oslobađanje arahidonske kiseline iz ćelijske membrane, i upravo ovaj korak predstavlja početnu i ključnu reakciju u biosintezi eikozanoida. Arahidonska kiselina, koja se najčešće nalazi u položaju 2 fosfolipida, može da bude oslobađena direktnim dejstvom fosfolipaze A₂ (PLA₂), ili, posredno, delovanjem fosfolipaze C (PLC) i diacilglicerol lipaze. Nasuprot ovim enzimima, delovanjem arahidonil-koenzim A sintetaze i lizofosfatidil-aciltransferaze (acil-koenzim A-1-acilglicero-3-fosfoglicerid *O*-acil transferaza) arahidonska kiselina se

reinkorporira u fosfolipidni dvosloj, te koncentracija slobodne arahidonske kiseline zavisi od odnosa brzina kojima se odigravaju ovi procesi (Marks i Fürstenberg, 1999).

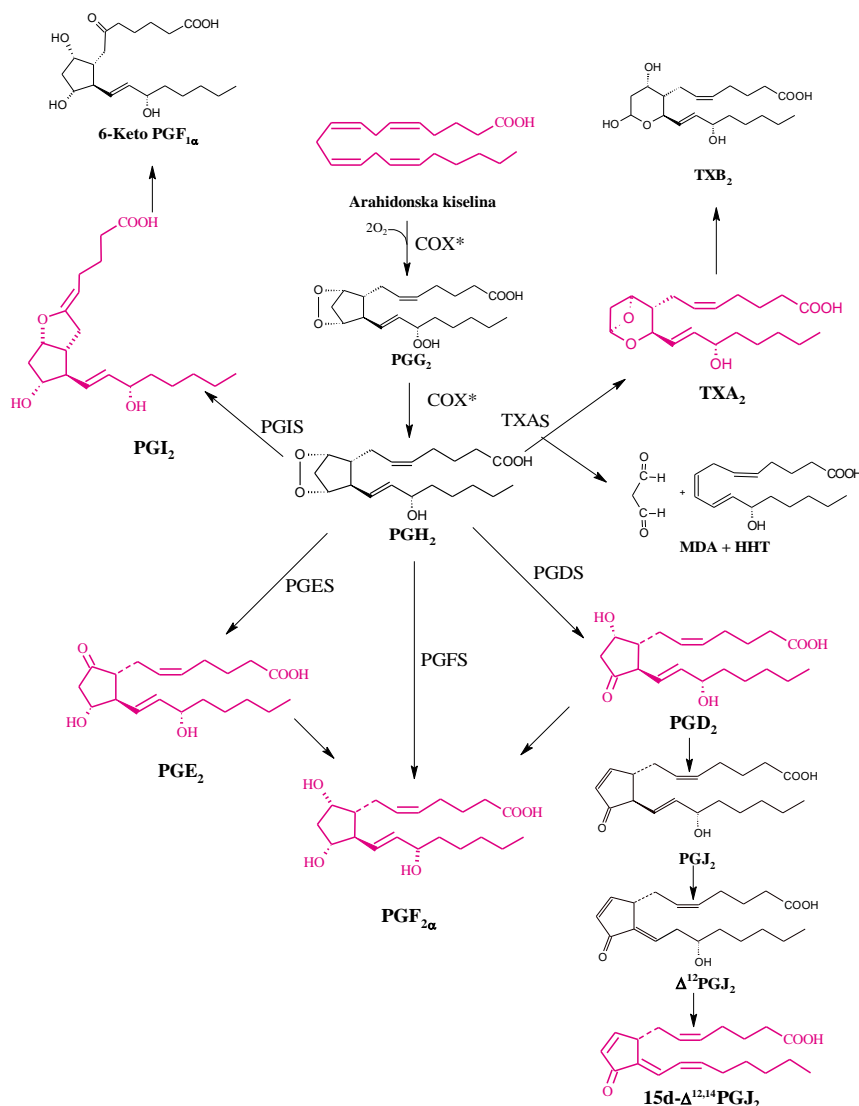
Slobodna arahidonska kiselina može biti metabolisana do eikozanoida delovanjem enzima ciklooksigenaza (COX) - ciklooksigenazni put, lipooksigenaza (LOX) - lipooksigenazni put ili citohrom P450 epoksigenaza (CYP450) - epoksigenazni put. U ciklooksigenaznom putu nastaju prostanoidi, prostaglandini i tromboksan, koji će u nastavku opšteg dela disertacije biti detaljnije opisani. Lipooksigenazni put započinje dejstvom jedne od tri izoforme lipooksigenaza: 5-LOX, 12-LOX i 15-LOX, a najčešće ispitivana je 5-LOX, jer učestvuje u sintezi proinflamatornih medijatora. Proizvodi LOX su: leukotrieni (LT), lipoksini, 5-*okso*-6,8,11,14-eikozatetraenska kiselina, hepoksilini i triksilini. Leukotrieni imaju važnu ulogu u oboljenjima kao što su alergije, artritis, psorijaza i astma, dok lipoksini ispoljavaju anti-inflamatorno delovanje. Enzim CYP450 katalizuje početnu reakciju epoksigenaznog puta, gde kao produkti nastaju: dihidroeikozatetraenske (DHET), epoksieikozatrienske (EET) i hidroksieikozatetraenske kiseline (HETE), koje doprinose održavanju homeostaze i sprečavanju inflamacije. Navedeni putevi nisu specifični za arahidonsku kiselinu, jer ovi enzimi mogu da oksiduju i druge masne kiseline. Proizvodi koji nastaju oksidacijom ω -3 masnih kiselina, EPA i DHA, mogu da doprinesu suzbijanju inflamacije. Metabolizmom EPA nastaju bioaktivni lipidni molekuli - resolvini serije E, dok od DHA nastaju resolvini serije D, protektini i maresini (Stables i Gilroy, 2011; Koeberle i Werz, 2018).

Četvrti put koji uključuje enzimsku modifikaciju arahidonske kiseline je sinteza endokanabinoida anandamida, delovanjem hidrolaze amida masnih kiselina (FAAH, *fatty acid amide hydrolase*; Marks i Fürstenberg, 1999; Sonnweber i sar., 2018).

Arahidonska kiselina može biti transformisana i neenzimskim putem, u reakciji sa reaktivnim azotnim ili kiseoničnim vrstama, pri čemu nastaju nitroeikozatetraenske kiseline i izoprostani (Sonnweber i sar., 2018). Osim što je prekursor bioaktivnih lipida, arahidonska kiselina može da aktivira nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidazu u leukocitima, blokira proliferaciju i inicira apoptozu (Brash, 2001).

4.2. Ciklooksigenazni (COX) put metabolizma arahidonske kiseline

Eikozanoidi koji nastaju u ciklooksigenaznom putu se zajedničkim imenom nazivaju prostanoidi, a šema nastajanja glavnih produkata metabolizma arahidonske kiseline ciklooksigenaznim putem je prikazana na *Slici 4.1*.



Slika 4.1. Ciklooksigenazni put biosinteze prostanoida iz oslobodene arahidonske kiseline

COX - ciklooksigenaza; HHT - hidroksiheptadekatrienoat; MDA - malonildialdehid; PG - prostaglandin, PGDS - PGD₂ sintaza; PGES - PGE₂ sintaza; PGFS - PGF_{2α} sintaza; PGIS - PGI₂ sintaza; TX - tromboksan, TXAS - TXA₂ sintaza; *COX - ispoljava i ciklooksigenaznu i peroksidaznu aktivnost (prilagođeno iz Marks i Fürstenberg, 1999 i Stables i Gilroy, 2011)

Nakon delovanja fosfolipaze i oslobađanja arahidonske kiseline iz fosfolipidnog dvosloja ćelijske membrane, biosinteza prostanoida započinje delovanjem ciklooksigenaze (COX ili prostaglandin H sintaza, PGHS), bifunkcionalnog hem-zavisnog enzima. Prva aktivnost ovog enzima, ciklooksigenazna, podrazumeva katalizu oksidacije arahidonske kiseline do prostaglandina G₂ (PGG₂), dok druga, peroksidazna aktivnost, obuhvata konverziju PGG₂ u prostaglandin H₂ (PGH₂). Sam PGH₂ nema

značajnu ulogu kao fiziološki medijator, već služi kao supstrat specifičnim enzimima, tromboksan i prostaglandin sintazama, koje proizvode stabilnije prostanoidne. Ovi prostanoidi obuhvataju prostaglandin E₂ (PGE₂), prostaglandin I₂ (PGI₂, prostaciklin), prostaglandin D₂ (PGD₂), prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) i tromboksan A₂ (TXA₂), a enzimi koji učestvuju u specifičnoj transformaciji PGH₂ su PGE₂ (PGES), PGI₂ (PGIS), PGD₂ (PGDS), PGF_{2α} (PGFS), i TXA₂ (TXAS) sintaze, redom. Koncentracija odgovarajućih prostanoida u ćelijama zavisi od ekspresije svih enzima neophodnih za njihovu sintezu: fosfolipaza, COX-1/2 i terminalnih enzima ovih sinteza (Marks i Fürstenberg, 1999).

U *Tabeli 4.1.* Prikazana su fiziološka dejstva najznačajnijih produkata ciklooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline.

Tabela 4.1. Fiziološka dejstva najznačajnijih prostanoida

Prostanoid	Fiziološko dejstvo	Referenca
PGE₂	Regulacija imunog odgovora, krvnog pritiska (vazodilatator), reprodukcije i funkcije bubrega; održavanje gastrointestinalnog integriteta; formiranje i zarastanje kostiju; razvoj kancera	Harizi i sar., 2008; Ricciotti i FitzGerald, 2011; Korbecki i sar., 2014
PGD₂	Regulacija sna i telesne temperature; olfaktorna funkcija; sekrecija hormona; nocicepcija u centralnom nervnom sistemu; inhibicija agregacije trombocita; izazivanje alergijskih reakcija, astme, bronhokonstrikcije i vazodilatacije; ispoljava i proinflamatorno i anti-inflamatorno delovanje	Harizi i sar., 2008; Ricciotti i FitzGerald, 2011; Joo i Sadikot, 2012
PGF_{2α}	Regulacija reproduktivnog sistema (ovulacija, luteoliza, kontrakcije materice); povezan je sa razvojem adenokarcinoma endometrijuma; izaziva kontrakcije malih krvnih sudova; učestvuje u akutnoj i hroničnoj inflamaciji	Harizi i sar., 2008; Ricciotti i FitzGerald, 2011; Korbecki i sar., 2014
PGI₂	Snažan vazodilatator; fiziološki agonist TXA ₂ koji smanjuje periferni, pulmonalni i koronarni otpor; najsnažniji poznati endogeni inhibitor aktivacije i agregacije trombocita; doprinosi osećaju bola; ispoljava antikancerogeno (antimitogeno i antimetastazno) delovanje	Harizi i sar., 2008; Cathcart i sar., 2010; Ricciotti i FitzGerald, 2011
15d-PGJ₂	Inhibicija sinteze citokina i inflamacije; regulacija ekspresije proinflamatornih gena i aktivacije makrofaga; indukcija apoptoze inflamatornih leukocita	Stables i Gilroy, 2011
TXA₂	Vazokonstriktor, bronhokonstriktor i faktor agregacije trombocita; uzrokuje proliferaciju glatkih vaskularnih mišićnih ćelija; stimuliše angiogenezu, metastazu, proliferaciju i invaziju tumora; doprinosi razvoju nefritisa, atopijskog dermatitisa, astme i alergija	Harizi i sar., 2008; Nakahata, 2008; Cathcart i sar., 2010; Crescente i sar., 2019

Iz priložene *Tabele 4.1.* se može uočiti da prostanoidi učestvuju u mnogobrojnim fiziološkim procesima, kako u onim neophodnim za normalno funkcionisanje organizma, tako i u patofiziološkim. Najširi spektar delovanja ispoljavaju u kardiovaskularnom, respiratornom, reproduktivnom, nervnom i gastrointestinalnom sistemu, a zajedno mogu da deluju sinergistički ili antagonistički. Na primer, PGI₂ i TXA₂ ispoljavaju fiziološki suprotne funkcije usled čega je njihov međusobni odnos važan za održavanje homeostaze organizma, prvenstveno kardiovaskularnog sistema. PGE₂ i PGF_{2α} su neophodni za pravilno funkcionisanje reproduktivnog sistema, dok je PGD₂ ima važnu ulogu u centralnom nervnom sistemu i alergijskim reakcijama. Takođe, svi mogu da učestvuju u akutnoj i hroničnoj inflamaciji, ispoljavajući proinflamatorno ili anti-inflamatorno delovanje. Prostanoid koji je najpoznatiji po svom anti-inflamatornom dejstvu je 15d-PGJ₂. Detaljniji prikaz mehanizma sinteze i delovanja, kao i fiziološka dejstva PGE₂ i TXA₂ biće prikazani u narednim poglavljima.

4.3. Prostaglandin E₂ (PGE₂) i tromboksan A₂ (TXA₂): mehanizam delovanja i biološka funkcija

U fokusu istraživanja prikazanih u ovoj disertaciji bila su dva produkta ciklooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline, prostanoidi PGE₂ i TXA₂.

Jedan od najintenzivnije proučavanih prostanoida je PGE₂, koji je deo kompleksne mreže signalnih puteva. PGE₂ sintetisan u ćeliji prolazi kroz membranu difuzijom ili pomoću adenzin trifosfat (ATP) zavisnih proteina rezistentnih na više lekova (MPR4, *ATP-dependent multidrug resistance protein 4*). PGE₂ deluje preko četiri različita tipa receptora za prostaglandin E₂ koji se označavaju kao EP1-4 (*E prostanoid receptor subtype 1-4*), a smatra se da su EP3 i EP4 najviše rasprostranjeni u organizmu. Svi EP pripadaju grupi transmembranskih receptora kuplovanih sa G proteinima (GPCR, *G protein-coupled receptors*). U zavisnosti od tkiva i mikrokruženja, zavisi i za koji receptor će se PGE₂ vezati, odnosno, u zavisnosti od interakcije receptora sa specifičnim G proteinom, razlikovaće se i kaskade koje se aktiviraju. EP1 je kuplovan sa Gα_q, aktivira signalni put koji uključuje PLC, inozitol-1,4,5-trifosfat (IP3) i diacilglicerol (DAG), što rezultuje povećanom koncentracijom Ca²⁺ unutar ćelije. EP2 i EP4 su kuplovani sa Gα_s, čija aktivacija vodi aktivaciji adenil ciklaze (AC) i povećanoj produkciji cikličog adenzin monofosfata (cAMP), a ova kaskada može da aktivira jedan od puteva kojima se indukuje ekspresija COX-2. EP3, koji je kuplovan sa Gi, deluje suprotno od EP2 i EP4, odnosno snižava nivo cAMP. U inaktivaciji PGE₂ ključnu ulogu imaju enzimi 15-ketoprostaglandin Δ¹³-reduktaza i 15-hidroksiprostaglandin dehidrogenaza (15-PGDH; Legler i sar., 2010; Ricciotti i FitzGerald, 2011; Korbecki i sar., 2014).

Tokom homeostaze, PGE₂ učestvuje u održavanju gastrointestinalnog integriteta, pravilnom funkcionisanju bubrega, implementaciji embriona, regulaciji krvnog pritiska, cirkadijalnog ritma i telesne temperature. Sa druge strane, uključen je u patogenezu mnogih bolesti, ispoljava proinflamatorno delovanje i odgovoran je za klasične znakove upale: otok, crvenilo i bol. Naime, otok i crvenilo su posledica PGE₂ posredovanog povećanja vazodilatacije arterija i mikrovaskularne permeabilnosti. Hiperalgizija je posledica sniženog praga nadražaja nociceptora usled vezivanja PGE₂ preko EP1 (manje EP3 i EP4) i PGI₂ preko receptora za prostaglandin I₂ (IP, *I prostanoid receptor*) na perifernim senzornim neuronima, kako na mestu inflamacije, tako i u centralnom nervnom sistemu. PGE₂ je uključen u genuzu tumora, stimuliše angiogenezu (delujući preko receptora EP2), invaziju i metastaziranje kancernih ćelija (delujući preko EP4). Međutim, iako je dugo smatran najvažnijim proinflamatornim medijatorom, PGE₂ ispoljava i anti-inflamatorno delovanje: snižava produkciju faktora nekroze tumora α (TNFα, *tumor necrosis factor*) i povećava produkciju interleukina 10 (IL-10), a u prvim fazama inflamacije može da aktivira transkripciju enzima uključenih u sintezu anti-inflamatornih lipidnih medijatora lipoksina, resolvina i protektina (Legler i sar., 2010; Ricciotti i FitzGerald, 2011; Stables i Gilroy, 2011).

TXA₂ ima izuzetno kratak poluživot (30 sekundi), nakon čega se neenzimski transformiše do neaktivnog tromboksana B₂ (TXB₂). TXA₂ je najpoznatiji kao faktor

agregacije trombocita, jer uzrokuje aktivaciju trombocita, promenu oblika trombocita praćenu njihovom agregacijom i stimuliše ponovnu sintezu TXA₂. TXA₂ ispoljava svoju biološku funkciju delujući preko tromboksan prostanoid receptora (TP, *thromboxane prostanoid receptor*), koji su ekspresovani u ćelijama različitih tkiva i organa: ćelijama kardiovaskularnog sistema (trombociti, endotelne ćelije), mozga, bubrega, slezine, timusa, uterusu, placentu. Široka rasprostranjenost TP svedoči o važnoj ulozi koju TXA₂ ima u organizmu. Postoje dva tipa ovih receptora: TP α , koji je dominantan u trombocitima, i TP β . Kao i receptori za PGE₂, TP pripadaju grupi GPCR, pri čemu se smatra da su najznačajnije kaskade koje uključuju proteine Gq i G12/13. Oba tipa TP mogu biti funkcionalno kuplovana sa Gq, koji pokreće aktivaciju PLC, akumulaciju IP₃ i DAG, indukujući oslobađanje Ca²⁺ i aktivaciju protein kinaze C (PKC). Upravo ova signalna kaskada izaziva vazokonstrikciju i agregaciju trombocita. Promena oblika trombocita je inicirana G12/13-Rho A signalnim putem. Osim toga, TP α može biti kuplovan i sa Gs, a TP β sa Gi. Gs protein indukuje aktivaciju adenil ciklaze, sintezu cAMP i indukciju protein kinaza A (PKA), dok Gi izoforma inhibira navedeni transdukcioni put. Osim tromboksana, ligandi ovih receptora su i izoprostani, produkti neenzimske oksidacije arahidonske kiseline (Dogné i sar., 2006; Nakahata, 2008; Cathcart i sar., 2010; Smyth, 2010).

TXA₂ se povezuje sa patogeneom mnogih bolesti kao što su kardiovaskularna oboljenja, ateroskleroza, tromboza, gestacijska hipertenzija i preeklampsija, plućna hipertenzija, razvoj i progresija kancera. Primećeno je da je ekspresija TR β povećana u tumorima kolona i mokraćne bešike. Osim što stimuliše agregaciju trombocita, u kardiovaskularnom sistemu stimuliše angiogenezu i migraciju endotelnih ćelija, ekspresiju adhezionih molekula: intracelularnog adhezionog molekula 1 (ICAM-1, *intracellular adhesion molecule-1*), adhezionog molekula vaskularnih ćelija 1 (VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule-1*) i adhezionog molekula leukocita i endotelijuma- 1 (ELAM-1, *endothelial leukocyte adhesion molecule-1*), kao i produkciju PGI₂ (Nakahata, 2008; Cathcart i sar., 2010; Kontogiorgis i Hadjipavlou-Litina, 2010).

U stanjima gde postoji povećana produkcija prostanoida, PGE₂ i TXA₂ stimulišu transformaciju normalnih ćelija u ćelije kancera. Takođe, doprinose metastazi, jer podstiču formiranje sloja agregiranih trombocita oko ćelija kancera, usled čega imuni sistem ne može da prepozna i uništi ćelije kancera (Crescente i sar., 2019).

4.4. Enzimi uključeni u produkciju PGE₂ i TXA₂

Kao što je ranije pomenuto, sinteza prostanoida zahteva sinhronizovanu aktivnost više enzima ciklooksigenaznog puta. Prve faze produkcije PGE₂ i TXA₂ obuhvataju delovanje fosfolipaza i ciklooksigenaza, a enzimi terminalnih faza su različiti, i uključuju jednu od tri prostaglandin E sintaze (PGES) ili tromboksan A sintazu (TXAS). U zavisnosti od organa, tipa ćelije i stanja organizma, aktivne su različite izoforme ovih enzima. U nastavku će biti detaljno opisano delovanje izoformi navedenih enzima u procesu inflamacije.

4.4.1. Fosfolipaze (PL)

Fosfolipaze (EC 3.1., PL) su ključni enzimi u metabolizmu fosfolipida, neophodni za sintezu signlalnih lipidnih molekula i time povezani sa mnogobrojnim fiziološkim i patofiziološkim stanjima. Na osnovu veze unutar molekula fosfolipida koju hidrolizuju, razlikuje se fosfolipaze A, B, C i D (PLA, PLB, PLC, PLD, redom.). U nastavku, funkcija i mehanizam delovanja fosfolipaza A₂ će biti najdetaljnije opisani, s obzirom da one imaju ključnu ulogu u oslobađanju arahidonske kiseline, odnosno prvoj fazi sinteze PGE₂ i TXA₂.

Fosfolipaze A hidrolizuju vezu u *sn*-1 (PLA₁) ili *sn*-2 (PLA₂) položaju fosfolipida pri čemu se oslobađa masna kiselina i acil-lizofosfolipid.

Fosfolipaze A₁ (EC 3.1.1.32) su prisutne kod velikog broja biljnih i životinjskih vrsta. Kod sisara se razlikuje devet PLA₁ enzima, od kojih su tri intracelularni, a šest ekstracelularni enzimi. Intracelularne PLA₁ (PLA_{1s}, KIAA0725p i p125) imaju ulogu u vezikularnom transportu. Ekstracelularne PLA₁ su bolje proučene, a uključuju protein povezan sa pankresnom lipazom ((PLRP)-2, *pancreatic lipase-related protein*), koji učestvuje u digestiji lipida, i endotelnu i hepatičnu lipazu, koje učestvuju u katabolizmu triacilglicerola. Najbolje su proučene PLA₁ specifična za fosfatidilserin (PS-PLA₁) i dve izoforme PLA₁ selektivne za membranski vezanu fosfatidinsku kiselinu (mPA-PLA_{1α} i mPLA_{1β}, *membrane-associated phosphatidic acid (PA) selective PLA₁*), jer oslobađaju važne lipidne signalne molekule i tako učestvuju u transdukciji signala (Richmond i Smith, 2011; Filkin i sar., 2020).

Fosfolipaze A₂ (EC 3.1.1.4) imaju veoma značajnu ulogu u sintezi lipidnih medijatora, održavanju homeostaze membrane (menjaju sadržaj fosfolipida koji je izgrađuju) i u produkciji energije, jer oslobađaju masne kiseline koje podležu β oksidaciji. Postoji šest osnovnih grupa fosfolipaza A₂: sekretorne (sPLA₂), citosolne (cPLA₂), Ca²⁺ nezavisne (iPLA₂), lizozomalne (LPLA₂), specifične za adipocite (AdPLA₂) i acilhidrolaze faktora agregacije trombocita (PAF, *platelet activating factor*; PAF-PLA₂; Leslie, 2015; Yarla i sar., 2016; Filkin i sar., 2020; Murakami i sar., 2020). Svaka od navedenih grupa obuhvata više izoenzima koji u različitim procesima mogu da deluju antagonistički, sinergistički, aditivno ili međusobno potpuno nezavisno (Yedgar i sar., 2006).

Sekretorne PLA₂ su na osnovu razlika u primarnoj strukturi proteina podeljene u 11 grupa: IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA, XIIB. Navedene grupe imaju različite afinitete prema supstratima - fosfolipidima. Grupe IB, IIA i IIE imaju isti afinitet prema fosfolipidima, nezavisno od toga koji tip masnih kiselina oni sadrže; grupe IID, IIF, III i X preferiraju fosfolipide sa arahidonskom i DHA, dok sPLA₂ V ima najveći afinitet za fosfolipide sa manje nezasićenim masnim kiselinama, kao što su linoleinska i oleinska (Murakami i sar., 2020).

sPLA₂ ispoljavaju različite funkcije u organizmu: imaju važnu ulogu u digestiji i odbrani organizma od bakterija, ali su isto tako uključene i u inflamatorne procese u skoro svim organima (ateroskleroza, astma, alergije, reumatoidni artritis, neuroinflamacije, sepsa, zapaljenske bolesti creva, upalne bolesti kože, respiratorni distres sindrom, dijabetes i kancer). IIA, V i X grupe sPLA imaju važnu ulogu u inflamatornim procesima (Yedgar i sar., 2006; Yarla i sar., 2016).

Ekspresija sPLA₂-IIA može biti povećana usled delovanja citokina, faktora nekroze tumora (TGF α), interleukina (IL) i eikozanoida, dok glukokortikoidi i anti-inflamatorni citokini kao što su transformišući faktor rasta β (TGF β , *transforming growth factor β*) i IL-10, supresuju njegovu ekspresiju. Isti proinflamatorni citokini aktiviraju i sPLA₂-V, ali je glukokortikoidi ne inhibiraju (Yedgar i sar., 2006). Geni za sPLA-IIA i za sPLA₂-V se nalaze na prvom hromozomu, pri čemu je gen za sPLA₂ bolje proučen. Promotorni region gena sPLA-IIA sadrži TATA i CAAT nukleotidni motiv i mesta za vezivanje transkripcionih faktora, od kojih su na humanom genu za sPLA-IIA najznačajniji CCAAT vezujući protein pojačivač (C/EBP, *CCAAT-enhancer-binding proteins*), specifičan protein 1 (SP-1, *specificity protein 1*) i transkripcioni faktor koji se veže za CAAT sekvencu/nuklearni faktor 1 (CTF/NF1, *CAAT box-binding transcription factor/nuclear factor 1*; Andreani i sar., 2000).

sPLA₂ su globularni proteini bogati cisteinom i sadrže 6–8 disulfidnih mostova. Sve sPLA₂ imaju pretežno hidrofoban region koji služi za vezivanje za fosfolipidni dvosloj. Ovaj region može da sadrži i polarne aminokiseline, ukoliko sPLA₂ hidrolizuje anjonske fosfolipide. U aktivnom centru (Asp-X-Cys-Cys-X-X-His-Asp) se nalaze histidin i asparaginska kiselina, koji su ključni za početak hidrolize. Kod većine sPLA₂ glicin i cistein čine region za vezivanje Ca²⁺ (X-Cys-Gly-X-Gly-Gly), koji je neophodan za stabilizaciju prelaznog stanja (Yarla i sar., 2016; Filkin i sar., 2020).

Osim što vrše hidrolizu fosfolipida, sPLA₂ mogu biti i ligandi M- i N-tipa receptora, i na taj način aktivirati različite signalne puteve u mišićnim i nervnim tkivima, redom (Yarla i sar., 2016; Filkin i sar., 2020).

Citosolne PLA₂ u homeostazi imaju važnu ulogu u intraćelijskom transportu, ženskom reproduktivnom sistemu i suzbijanju astme, dok njihova povećana aktivnost doprinosi mnogim patofiziološkim procesima, kao što su ateroskleroza, neurodegenerativne bolesti, hronične inflamatorne bolesti kože. Postoji šest izoformi ovog enzima: cPLA₂ α (GIVA PLA₂), cPLA₂ β (GIVB PLA₂), cPLA₂ γ (GIVC PLA₂), cPLA₂ δ (GIVD PLA₂), cPLA₂ ϵ (GIVE PLA₂) i cPLA₂ ζ (GIVF PLA₂), od kojih je trenutno najbolje proučena α , a ostale izoforme se intenzivno ispituju. One ispoljavaju različite aktivnosti, a poznato je da jedino cPLA₂ α ima izražen afinitet za fosfolipide koji sadrže arahidonsku kiselinu u sn-2 položaju. Pretpostavlja se da cPLA₂ β učestvuje u

razvoju karcinoma kože, modifikaciji fosfolipida usled starenja i smanjenom energetskom metabolizmu u monocitima. cPLA₂γ je visoko ekspresovna u srčanim i skeletnim mišićima ljudi, a doprinosi i akumulaciji lipida u jetri (masna jetra), cPLA₂δ se indukuje tokom psorijaze, cPLA₂ε ima potencijalnu neuroprotektivnu ulogu, a cPLA₂ζ je prisutna u miokardijumu i pretpostavlja se da učestvuje u sintezi lipida koji deluju protektivno (Murakami i sar., 2020). Regulacija cPLA₂ se vrši na više različitih načina, kako na transkripcionom, tako i na posttranslacionom nivou (Yedgar i sar., 2006; Leslie, 2015).

cPLA₂α je ekspresovana u mnogim ćelijama tokom homeostaze, ali povećana ekspresija može biti indukovana različitim proinflamatornim medijatorima: interleukinima, citokinima, eikozanoidima, hormonima, neurotransmiterima, bakterijskim lipopolisaharidima (LPS), hipoksijom. Gen za cPLA₂ se nalazi na prvom hromozomu, a promotorni region sadrži mesta za vezivanje nekoliko transkripcionih faktora, uključujući nuklearni faktor κB (NF-κB, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells- nuclear factor kappa B*), aktivirajući protein 1 (AP-1, *activating protein*), C/EBP i Sp1, usled čega ekspresija cPLA₂ može biti aktivirana različitim signalnim kaskadama koje uključuju NF-κB signalni put i mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK, *mitogen-activated protein kinase*), Ras i c-Jun kinaze ili hipoksijom inducibine faktore (Leslie, 2015; Yarla i sar., 2016).

Na posttranslacionom nivou cPLA₂α može biti aktivirana povećanom koncentracijom Ca²⁺ i vezivanjem sekundarnih glasnika (IP₃ ili ceramid-1-fosfat) ili fosforilacijom serinskih ostataka u položaju 437, 459, 505 i 727 delovanjem MAPK ili PKC (Dessen i sar., 1999; Yarla i sar., 2016; Filkin i sar., 2020). Jednu od kaskada kojom se aktiviraju ove kinaze indukuje vezivanje sPLA₂ za receptore na membrani ćelije (Yarla i sar., 2016). Za razliku od sPLA₂, kod kojih Ca²⁺ učestvuje u reakciji hidrolize u katalitičkom centru, u slučaju cPLA₂α, Ca²⁺ ima ulogu aktivatora i time omogućava vezivanje cPLA₂ za membranu, zbog čega je potrebna niža koncentracija Ca²⁺ za aktivnost cPLA₂α. Region za vezivanje Ca²⁺ jona (Asp40-Thr41-Asp43-Asn65-Asp93-Ala94-Asn95) se nalazi na N-kraju peptida. Mehanizam delovanja cPLA₂α je detaljno proučen. Nakon aktivacije, cPLA₂α interaguje sa membranom endoplazmatičnog retikuluma, nukleusa ili Goldžijevog aparata preko triptofana (Trp464). Supstrat se vezuje u aktivan centar pozicionirajući sn-2 estarsku vezu blizu serina u položaju 228, dok polarni deo interaguje sa argininom (Arg200). Reakciju hidrolize započinje aspartat u položaju 549 tako što apstrahuje proton sa serina u položaju 228, koji dalje vrši nukleofilni napad na kiseonik estarske veze. Za stabilizaciju oksianjonskog prelaznog stanja neophodna su dva ostataka glicina (Gly197 i Gly198; Dessen i sar., 1999; Yarla i sar., 2016).

Kalcijum nezavisne PLA₂ (iPLA₂) ne pokazuju supstratnu specifičnost, ali učestvuju u oslobađanju arahidonske kiseline. Postoji sedam izoformi humanih iPLA₂ (GVI PLA₂): iPLA₂β (VIA-1 i VIA-2), iPLA₂γ (VIB), iPLA₂δ (VIC), iPLA₂ε (VID), iPLA₂ζ (VIE) i iPLA₂η (VIF), a najbolje su proučene iPLA₂β i iPLA₂γ. Smatra se da iPLA₂ predstavljaju enzime koji su zaduženi za homeostazu („housekeeping“ enzimi), odnosno remodelovanje fosfolipida tokom osnovnih ćelijskih funkcija i ispoljavaju važnu ulogu u apoptozi, proliferaciji ćelija, spermatogenezi, sekreciji insulina, nervnom i

kardiovaskularnom sistemu. Usled poremećaja funkcije iPLA₂β javljaju se različita oboljenja. Primećena je povećana aktivnost iPLA₂β kod kancera jajnika, kolona i melanoma. iPLA₂β su prisutne u mnogim ćelijama imunog sistema u kojima ispoljavaju specifične funkcije. Smatra se da je iPLA₂β odgovorna za akumulaciju slobodnih masnih kiselina u makrofagama, proliferaciju makrofaga i njihovu aktivaciju, translokaciju i adheziju na mestu inflamacije. Naime, za adheziju makrofaga su neophodni metaboliti 12- i 15-lipooksigenaznog puta arahidonske kiseline oslobođene delovanjem iPLA₂β. Produkti iPLA₂β mogu da imaju važnu ulogu i u razvoju autoimunih bolesti. Takođe, postoje indicije da PGE₂, LTB₄ (leukotrien B₄) i PAF, nastali deovanjem iPLA₂β, učestvuju u inicijalnom imunom odgovoru, dok metaboliti nastali delovanjem sPLA₂ (IIa i V) i cPLA₂ imaju ulogu u suzbijanju upale. Nedostatak iPLA₂γ doprinosi kognitivnim poremećajima, miokardinalnoj disfunkciji i mitohondrijalnoj degradaciji, ali istovremeno produžava vreme krvarenja i sprečava tromboemboliju. iPLA₂δ ima ulogu u pravilnom funkcionisanju nervnog sistema, a iPLA₂ε je jedan od markera fibroze jetre. Smatra se da iPLA₂ε, iPLA₂ζ i iPLA₂η doprinose akumulaciji lipida u krvi, što je povezano sa metaboličkim sindromom i dijabetesom tipa 2 (Ramanadham i sar., 2015; Filkin i sar., 2020).

Gen za iPLA₂γ se nalazi na sedmom hromozomu, dok je gen za iPLA₂β lociran na 22 hromozomu i kodira dve funkcionalne forme enzima, VIA-1 koja nastaje transkripcijom 15 egzona i VIA-2 koja nastaje transkripcijom 16 egzona navedenog gena. iPLA₂β se nalazi u citosolu, a pod dejstvom stimulusa se premešta na membranu Godžijevog aparata, endoplazmatičnog retikuluma, mitohondrije ili jedra. Može biti aktivirana različitim signalnim putevima: vezivanjem kalmodulina, ATP-a, fosforilacijom, razgradnjom kaspaze-3, a u aktivnoj formi se nalazi u obliku dimera. iPLA₂β i iPLA₂γ sadrže Ser i Asp u katalitičkom centru i istu sekvencu za vezivanje ATP na C-terminusu, dok razlike na N- terminusu mogu da uzrokuju različite funkcije (Ramanadham i sar., 2015; Filkin i sar., 2020).

PAF acetilhidrolaze (E.C. 2.3.1.149) su tip PLA₂ koje hidrolizuju PAF (1-alkil-2-acetil-*sn*-gliceril-fosfoholin), potentni lipidni medijator koji ima brojne funkcije, prvenstveno u kardiovaskularnom sistemu. One mogu da hidrolizuju i druge fosfolipide koji u *sn*-2 položaju sadrže masne kiseline sa najviše devet ugljenikovih atoma. U aktivnom centru, PAF acetilhidrolaze sadrže tri aminokiseline (His, Ser, Asp) i kataliza se odigrava bez prisustva Ca²⁺ jona. Postoje dve grupe PAF acetilhidrolaza, VII i VIII. Poznato je da grupa VIII u C-regonu sadrži mesto za vezivanje lipoproteina male gustine (LDL, *low density lipoproteins*) i lipoproteina velike gustine (HDL, *high-density lipoproteins*). Predstavljaju jedan od markera kardiovaskularnih bolesti, čiji inhibitori se koriste u tretmanu istih (Burke i Dennis, 2009; Yarla i sar., 2016).

AdPLA₂ (GXVI PLA₂) i LPLA₂ (GXV PLA₂) su najslabije proučene, a pripadaju grupi Ca²⁺ nezavisnih fosfolipaza. AdPLA₂ je ekspresovana prvenstveno u adipocitima, a ima ulogu u metabolizmu vitamina A, insulinskoj rezistenciji, imunom odgovoru. U aktivnom centru sadrži sekvencu Cis-His-His. LPLA₂ se nalazi u lizozomima, hidrolizuje veze i u *sn*-1 i u *sn*-2 položaju, aktivna je u blago kiselim sredinama, a katalitičku trijadu čine Ser-Asp-His. Smatra se da LPLA₂ učestvuje u imunom odgovoru i katabolizmu plućnog surfaktanta (Yarla i sar., 2016, Murakami i sar., 2020).

Fosfolpaze B (EC 3.1.1.5) hidrolizuju veze i u *sn*-1 i u *sn*-2 položaju, oslobađajući dve masne kiseline. U odnosu na druge fosfolipaze imaju nižu specifičnost, zbog čega mogu biti toksične za ćeliju usled potencijalne neselektivne hidrolize fosfolipida ćelijske membrane (Filkin i sar., 2020).

Fosfolipaze C (EC 3.1.4.3) hidrolizuje glicerofosfatnu vezu, oslobađajući važne sekundarne glasnike DAG i IP₃, koji u signalnoj kaskadi deluju na PKC i na koncentraciju Ca²⁺ unutar ćelije. PLC mogu biti aktivirane različitim signalnim molekulima. Na osnovu mehanizma regulacije i strukture, razlikuje se šest grupa PLC koje obuhvataju trinaest izoenzima PLC, ekspresovanih u različitim tkivima i uključenih u različite signalne puteve. Regulišu funkciju i aktivaciju hematopoetskih ćelija, učestvuju u neuroinflamaciji, inflamatornim oboljenjima kože i srčanim bolestima, imaju važnu ulogu u reproduktivnom sistemu, tokom oplodjenja i održavanja trudnoće (Nakamura i Fukami, 2017; Filkin i sar., 2020). Takođe, kao što je ranije navedeno, PLC učestvuje u dvostepenom procesu oslobađanja arahidonska kiseline iz membranskih fosfolipida.

Fosfolipaze D (EC 3.1.4.4) hidrolizuju fosfodiastarsku vezu, najčešće fosfatidilholina, pri čemu se oslobađa fosfatidinska kiselina i alkohol. Detektovanih šest izoformi ovog enzima imaju različite uloge, a najbolje su proučene PLD₁ i PLD₂. PLD učestvuju u imunom odgovoru, razvoju i obnavljanju mišića, fertilizaciji, ali i razvoju kancera, Alchajmerove bolesti, autizma i fibroze tkiva (Nelson i Frohman, 2015).

4.4.2. Ciklooksigenaza-1 (COX-1) i ciklooksigenaza-2 (COX-2)

Dve osnovne izoforme ciklooksigenaze (EC 1.14.99.1, prostaglandin H sintaze, PGHS), su COX-1, koji je konstitutivni enzim, i COX-2, koji je inducibilni enzim. Iako predstavljaju produkte različitih gena i imaju različite mehanizme ekspresije, ovi enzimi poseduju sličnu strukturu i ispoljavaju iste katalitičke aktivnosti. Smatrano je da COX-1 produkuje prostanoide koji su uključeni u homeostazu, kao na primer u regulaciju vaskularnog odgovora, agregaciju trombocita, reprodukciju, održavanje bubrežne funkcije i protektivno delovanje u gastrointestinalnom traktu, a da su isti prostanoidei proizvodjeni delovanjem COX-2 povezani sa upalom i drugim patološkim stanjima kao što su autoimune bolesti i kancer (Goldenberg, 1999). Međutim, danas se zna da je ekspresija COX-1 enzima povećana i u nekim patološkim stanjima, dok se COX-2 u homeostazi može detektovati i u mozgu, plućima, bubrezima, srcu, endotelnim ćelijama, jajnicima i testisima (Marks i Furstenberger, 1999; Félétou i sar., 2011). Smatra se da je COX-1 uključena u primarni imuni odgovor, dok COX-2 produkuje prostanoide tokom kasnijih faza inflamacije (Perrone i sar. 2010). Pored pomenutih, postoji još nekoliko manje proučenih varijanti ove dve izoforme ciklooksigenaza (Davies i sar., 2004; Warner i Mitchell, 2016).

Ekspresija ova dva COX izoenzima je različito regulisana na transkripcionom i posttranskripcionom nivou (Goldenberg, 1999). Gen za COX-1 se nalazi na devetom hromozomu, dok je gen za COX-2 lokalizovan na prvom hromozomu. Ovi geni se razlikuju i po svojim promotornim regionima i po transkripcionim faktorima, što

predstavlja osnovu za različite načine njihove regulaciji (Goldenberg, 1999; Marks i Furstenberger, 1999; Tanabe i Tohnai, 2002).

Promotorni region gena za COX-1 je bogat GC parovima, a ne sadrži TATA sekvencu (TATA *box*) ili CAAT sekvence, što predstavlja odliku gena koji su zaduženi za homeostazu („housekeeping“ geni). Rezultati *in vitro* ispitivanja na različitim ćelijskim linijama pokazuju da promotorni deo COX-1 gena sadrži samo sekvence za vezivanje transkripcionih faktora Sp1 i AP-1 (Kang i sar., 2007). Iako je u većini ćelija COX-1 konstantno prisutna, povišena ekspresija COX-1 detektovana je u ćelijama kancera ovarijuma (Gupta i sar., 2003; Daikoku i sar., 2005; Sugimoto i sar., 2007), dojke (Hwang i sar., 1998), usne duplje (Mauro i sar., 2010), vrata i glave (Erović i sar., 2007), aterosklerozi (Gabrielsen i sar., 2010), neuroinflamaciji (Perrone i sar., 2010, Yang i sar., 2020).

Treća izoforma ciklooksigenaza, koja je ekspresovana u cerebralnom korteksu i srcu, COX-1b (nekada nazivana i COX-3), je takođe kodirana genom za COX-1, ali se pri sintezi informacione ribonukleinske kiseline (mRNK, *messenger ribonucleic acid*) za COX-3 transkribuje i intron 1, što uslovljava razlike između ova dva proteina (Davies i sar., 2004; Warner i Mitchell, 2016).

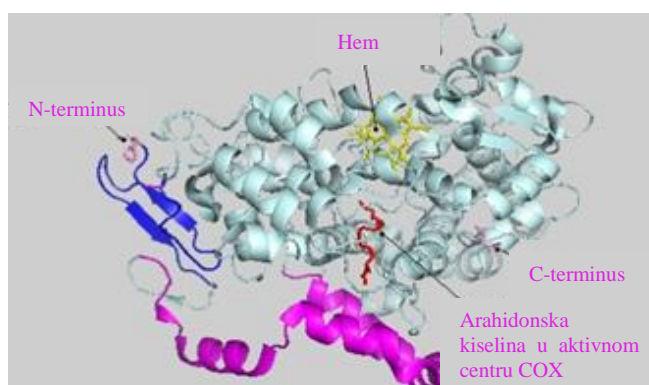
Ekspresija COX-2 može biti indukovana stimulacijom ćelije proinflamatornim citokinima, hormonima, bakterijskim toksinima, faktorima rasta, interleukinima, prostanoidima, oksidativnim stresom, mehaničkim stimulusima, UV radijacijom, dok glukokortikoidi i receptori aktivirani proliferatorom peroksizoma γ (PPAR γ , *peroxisome proliferator-activated receptor*) mogu da supresuju transkripciju COX-2 gena. Brojna mesta za različite transkripcione faktore omogućavaju osetljivost gena na aktivaciju divergentnim signalnim putevima. U zavisnosti od okolnih signala, ali i tipa ćelije, razlikuju se signalni putevi koji će biti aktivirani, a nekad isti medijator može da aktivira i više signalnih kaskada. Od potencijalnih regulatornih mesta definisani su sekvencija pojačivača (E-box, *enhancer box*), element regulisan cAMP (CRE, *cAMP-response element*), element regulisan serumom (SRE, *serum response element*), element regulisan sa PPAR (PPRE, *peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) response element*), TATA-box, NF-IL6 motiv, sekvence koje prepoznaju transkripcione faktore poput NF- κ B, AP-2, C/EBP, Sp1 i nuklearnog faktora aktiviranih T ćelija (NFAT, *nuclear factor of activated T cells*; Tanabe i Tohnai, 2002; Chun i Surh, 2004; Kang i sar., 2007).

Transkripti gena za COX-2 se degradiraju brzo, a njihova stabilizacija delovanjem proinflamatornih citokina učestvuje u povećanju koncentracije mRNK COX-2. Nasuprot tome, kortikosteroidi mogu da destabilizuju mRNK i da ometaju translaciju COX-2, bez uticaja na ekspresiju COX-1. Na 3' kraju COX-2 mRNK nalazi se deo koji ne podleže translaciji (3'UTR, 3' *untranslated region*) i koji sadrži AU-bogate sekvence (AREs, *adenylate-uridylate-rich elements*) za koje se smatra da podstiču brzu razgradnju mRNK u fiziološkim uslovima. U nekim patološkim stanjima, proteini koji se vežu na ARE stabilizuju mRNK COX-2 i omogućavaju pojačanu proteinsku ekspresiju u odnosu na COX-1. Takođe, ekspresija COX-2 može biti regulisana i malim nekodirajućim RNK (mikroRNK ili miRNK) koje se vezuju za komplementarne sekvence 3'UTR. Ekspresija COX-2 je povećana u različitim inflamatornim, patološkim stanjima. Postoje indicije da je uspešnost hemoterapije obrnuto proporcionalna ekspresiji COX-2 (Goldenberg, 1999;

Marks i Furstenberger, 1999; Tanabe i Tohnai, 2002; Chun i Surh, 2004; Kang i sar., 2007; Mbonye i sar., 2009; Cerella i sar., 2010).

Ciklooksigenaze podležu i posttranslacionim modifikacijama. Obe izoforme podležu *N*-glikozilaciji koja je neophodna za sintezu funkcionalnih proteina. COX-2 može biti i fosforilovana i *S*-nitrozilovana, a ove modifikacije uzrokuju povećanu aktivnost COX-2 tokom neuroinflamacije. Dodatno, *N*-glikozilacija Asn580 COX-2 pokreće razgradnju proteina (Cerella i sar., 2010).

Trodimenzionalne strukture COX-1 i COX-2 se skoro preklapaju, jer je oko 60% aminokiselinskog sastava identično kod oba enzima. Humane COX-1 i COX-2 su homodimeri koji se sastoje od 576 i 581 aminokiselina, redom. Svaka subjedinica dimera sastoji se od tri domena: domena sličnog faktoru rasta, domena za vezivanje na membranu i domena sa katalitičkom aktivnošću. Domen sa katalitičkom aktivnošću sadrži hem i ciklooksigenazno i peroksidazno aktivno mesto na obe strane prostetske grupe (Slika 4.2). Aminokiselinska sekvenca potrebna za vezivanje hema identična je kod oba izoenzima. Ciklooksigenazni aktivni centar se nalazi na dnu dugačkog, uzanog hidrofobnog kanala, unutar dela kojim je COX vezana za membranu. Na suprotnoj strani od vezivnog centra nalazi se peroksidazno aktivno mesto i hem pozicioniran na dnu plitkog udubljenja (Curtis-Prior, 2004; Rouzer i Marnet, 2009).



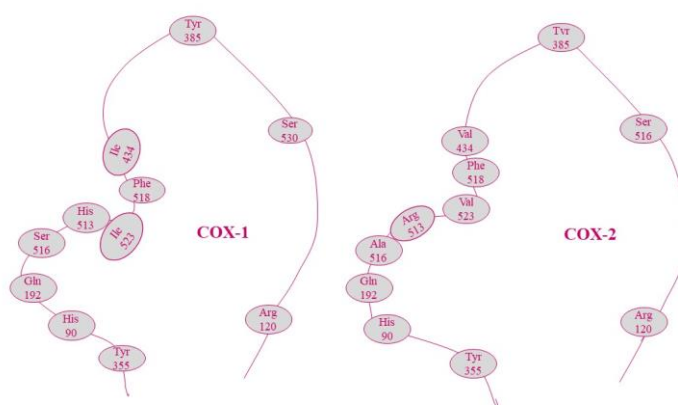
Slika 4.2. Strukturne podjedinice ciklooksigenaza

Domen sličan faktoru rasta (plavo), domen za vezivanje na membranu (ljubičasto) i domen sa katalitičkom aktivnošću (sivo)

Strukture dve izoforme ciklooksigenaze se razlikuju na *C*- i *N*-terminusu, kao i na heliksima u vezivnom centru. COX-1, za razliku od COX-2, ima hidrofobnu sekvencu od 17 amino kiselina na *N*-terminusu. Nasuprot tome, COX-2 sadrži fragment od 19 amino kiselina (uglavnom hidrofilnih), koji se nalazi blizu *C*-terminusa. Razlike u aminokiselinskoj strukturi uslovljavaju razlike u vremenu poluživota između dve izoforme. Degradacija COX-1 proteina je veoma spora, dok je vreme poluživota COX-2 između dva i sedam časova. Kraće vreme poluživota COX-2 izoforme određeno je sekvencom od 19 aminokiselina na *C*-terminusu, koja uzrokuje nestabilnost proteina podstičući proteosomalnu razgradnju (Mbonye i sar., 2006; Kang i sar., 2007).

Najznačajnija razlika između aktivnih centara izoformi ciklooksigenaze je u položaju 523, u kom se kod COX-1 se nalazi izoleucin, a kod COX-2 valin. Prisustvo manjeg bočnog lanca valina omogućava nastanak hidrofobnog džepa u zidu hidrofobnog

kanala COX-2. Takođe, umesto Ile434 u izoformi COX-1, u molekulu COX-2 se nalazi Val. Ova supstitucija povećava mobilnost Phe518, čijim pomeranjem se povećava pristup bočnom džepu. Zbog ovih promena u sekvenci aminokiselina, hidrofobni kanal izoforme COX-2 je za 25% veći nego kod COX-1, što omogućava vezivanja mnogih selektivnih lekova. Arginin u položaju 513 kod COX-2 (kod COX-1 se u ovom položaju nalazi His) je važan za vezivanje selektivnih inhibitora COX-2 (Slika 4.3.; Kurumbail i sar., 1996; Goldenberg, 1999; Marks i Furstenberger, 1999).



Slika 4.3. Ključne razlike u strukturi COX-1 i COX-2 enzima

(prilagođeno iz Knights i sar., 2010)

Osim u strukturi, uočene su razlike i u osetljivosti enzima na prisustvo arahidonske kiseline i u afinitetu za kuplovanje sa narednim enzimima ciklooksigenaznog puta. Naime, za aktivnost COX-2 su potrebne niže koncentracije arahidonske kiseline. Smatra se da COX-1 ima veći afinitet ka kuplovanju sa TXAS, PGFS, i citosolnom PGES, dok COX-2 preferira membransku PGES-1 i PGIS. Takođe, za razliku od COX-1, COX-2 može da oksiduje veći broj supstrata, uključujući i ω -3 masne kiseline i estarske i amidne derivate arahidonske kiseline (Rouzer i Marnet, 2009; Ricciotti i FitzGerald, 2011).

Mehanizam transformacije arahidonske kiseline do PGH₂ je poznat. Arahidonska kiselina, oslobođena iz membrane prolazi kroz hidrofobni kanal ciklooksigenaze i smešta se u aktivni centar enzima. Aminokiseline koje učestvuju u vezivanju i stereospecifičnoj orijentaciji arahidonske kiseline su: arginin (Arg120), serin (Ser530) i tirozin (Tyr385). Pozitivno naelektrisan ostatak Arg120 jonskim vezama interaguje sa karboksilnom grupom, a serinski ostatak sa nepolarnim repom arahidonske kiseline, obezbeđujući konformaciju u kojoj se Tyr385 nalazi u blizini *H*-13 *pro*-S atoma arahidonske kiseline. Tirozinski ostatak, smešten između hema i vezivnog centra, ključan je za katalitičku funkciju ciklooksigenaze, jer inicira apstrakciju vodonika iz arahidonske kiseline. Naime, reakcija započinje dvoelektronskom oksidacijom gvožđa iz hema do feril-okso protoporfirinskog radikala, koji zatim oksiduje Tyr385 do tirozil radikala. Arahidonil radikal nastaje apstrahovanjem *H*-13 *pro*-S atoma arahidonske kiseline od strane tirozil radikala, i podleže izomerizaciji do ugljenik-centriranog radikala na atomu *C*-11. U reakciji ovog radikala i molekula kiseonika nastaje 11-hidroperoksil radikal koji gradi intramolekulsku vezu sa *C*-9, što je praćeno formiranjem *C*-8-centriranog radikala. U

reakciji C-8-centriranog radikala sa C-12, gradi se biciklični endoperoksid i ugljenik-centrirani radikal na atomu C-15. Krajnji korak ciklooksigenazne reakcije je redukcija peroksid radikala do PGG₂, i regeneracija tirozil radikala, koji se vraća u peroksidazni deo enzimske reakcije. Na atomu C-15 u molekulu PGG₂ vrši se dvoelektronska redukcija hidroperoksidne grupe do hidroksilne i nastaje PGH₂ (Marnett, 2000; Chandrasekharan i Simmons, 2004; Rouzer i Marnet, 2009).

4.4.3. Prostaglandin E sintaze (PGES)

Prostaglandin E sintaze (PGES, EC 5.3.99.3) katalizuju izomerizaciju PGH₂ u PGE₂. Postoje tri vrste humane PGES: membranska PGE sintaza 1 (mPGES-1), membranska PGE sintaza 2 (mPGES-2) i citosolna PGE sintaza (cPGES). Membranska PGES-1 i cPGES pripadaju familiji glutation S-transferaza, dok mPGES-2 ne zahteva glutation za svoju katalitičku aktivnost. Ovi enzimi su neravnomerno zastupljeni u različitim tkivima, tako da PGE₂ koji nastaje delovanjem ove tri izoforme ima drugačije funkcije u organizmu (Park i sar., 2006).

cPGES je konstitutivni enzim, kuplovan sa aktivnošću COX-1 i ima ulogu u proizvodnji PGE₂ tokom homeostaze. Nasuprot tome, mPGES-1 je prvenstveno kuplovana sa COX-2, tako da je povećana sinteza PGE₂ u procesima zapaljenja, groznice, osteogeneze i kancera indukovana stimulacijom ovih enzima. Međutim, analogno sa distribucijom COX-2, mPGES-1 je konstatno ekspresovana u jajnicima, testisima, prostati, bubrezima i mokraćnoj bešici. Treća izoforma ovog enzima, mPGES-2 je konstitutivno ekspresovan enzim, prvenstveno u srcu, mozgu, bubrezima i jetri, ali je otkriveno i da se indukuje u određenim patološkim uslovima, na primer u ćelijama kolorektalnog adenokarcinoma. mPGES-2 može biti kuplovana sa obe izoforme enzima COX, ali ispoljava nešto veći afinitet ka COX-2 (Park i sar., 2006).

Gen za cPGES se nalazi na dvanaestom hromozomu, bogat je GC parovima i sadrži nekoliko SP1 regulatornih mesta. Ekspresija ovog enzima je konstantna, ali je moguća regulacija same aktivnosti. Na primer, nakon stimulacije ćelije citokinima, uočena je translokacija cPGES iz citosola na membranu endoplazmatočog retikuluma i povećana produkcija PGE₂ (Park i sar., 2006; Hara i sar., 2010).

Proteinska struktura cPGES je identična strukturi proteinskog čaperona p23, koji gradi kompleks sa proteinom toplotnog šoka Hsp90 (*heat shock protein 90*). Svoju aktivnost cPGES ispoljava u kompleksu sa Hsp90. Za aktivnost je neophodna fosforilacija Ser113 i Ser118 delovanjem proteinske kinaze CK2 (prethodno nazivane *casein kinase 2*). Takođe, kao što je navedeno, potrebno je i prisustvo glutationa koji interaguje sa Tyr9 (Park i sar., 2006, Hara i sar., 2010). O značaju ovog enzima svedoči činjenica da *in vivo* ispitivanja na životinjama kojima je utišan gen za cPGES nisu bila moguća, jer je utišavanje ovog gena vodilo prenatalnoj smrti usled slabo razvijenih pluća, kože i poremećaja rasta (Hara i sar., 2010).

Gen za mPGES-1 nalazi se na devetom hromozomu, i promotorni region je bogat sekvencama za vezivanje različitih transkripcionih faktora. Bogat je GC parovima, ali, za razliku od COX-2, nedostaje TATA box i AUUUA na 3' kraju mRNK. Ekspresija mPGES-1 može biti stimulirana različitim proinflamatornim interleukinima, citokinima,

bakterijskim toksinima, koji aktiviraju MAPK, ERK (*extracellular-signal regulated kinase*) ili p38 signalne kaskade koji stimulišu vezivanje transkripcionog faktora, proteina Egr-1 (*early growth response protein 1*) i NF- κ B transkripcionog faktora na promotorni region gena. Glukokortikoidi i 15-dPGJ₂ mogu da inhibiraju ekspresiju mPGES (Park i sar., 2006; Hara i sar., 2010; Koeberle i sar., 2016).

mPGES-1 pripada familiji membranskih proteina uključenih u metabolizam eikozanoida i glutationa (MAPEG, *membrane-associated proteins involved in eicosanoid and glutathione metabolism*). mPGES-1 sadrži 152 aminokiseline i u ćeliji se nalazi u formi trimera, čija svaka podjedinica sadrži četiri transmembranska heliksa. Aktivni centar je smešten u udubljenju između podjedinica, tako da jedan enzim ima tri mesta za vezivanje supstrata. Glutathion se nalazi blizu aktivnog centra i interaguje vodoničnim vezama sa bočnim ostacima polarnih aminokiselina heliksa I (Arg38), II i IV (Arg73, Asn74, Glu77, His113, Tyr117, Arg126, Ser127), kao i π - π interakcijama sa Tyr130. PGH₂ se vezuje tako da je endoperoksidna veza okrenuta ka aktivnom centru. Pretpostavlja se da Ser127 ima ključnu ulogu u katalizi jer stabilizuje tiolatni anjon glutathiona. U reakciji učestvuje i asparaginska kiselina u položaju 49, koja proksimalno intereaguje sa argininom u položaju 126. Pretpostavljena su dva mehanizma reakcije, u jednom tiolat vrši nukleofilni napad na endoperoksidnu vezu, dok u drugom deluje kao baza koja apstrahuje proton sa devetog ugljenikovog atoma PGH₂, usled čega dolazi do raskidanja endoperoksidne veze (Sjögren i sar., 2013; Koeberle i sar., 2016). *In vivo* ispitivanja na životinjama kojima je utišan gen za mPGES-1 (*knocked out*) pokazuju da PGE₂ nastao delovanjem mPGES-1 ima ulogu u mnogim patološkim stanjima (inflamacija, bolesti nervnog sistema, tumorgeneza), ali i zaštiti mukoze gastrointestinalnog trakta i renalnoj homeostazi (Hara i sar., 2010).

Gen za mPGES-2 je lokalizovan na devetom hromozomu (zajedno sa genom za COX-1 i mPGES-1). N-terminalnim regionom protein je pričvršćen za membranu Goldžijevog aparata i aktivan je u formi dimera. Za razliku od drugih PGES, za aktivnost mPGES-2 nije potreban glutathion. Aktivni centar enzima je smešten unutar domena sličnog glutaredoksinu koji sadrži sekvencu Cys-X-X-Cys. Smatra se da PGH₂ u aktivnom centru interaguje sa tiolnom grupom cisteina u položaju 110. Tačna uloga mPGES-2 još uvek nije u potpunosti razjašnjena, a rezultati nekih ispitivanja sugerisu da u određenim patološkim stanjima preuzima ulogu cPGES i mPGES-1 (Park i sar., 2006; Hara i sar., 2010; Koeberle i sar., 2016).

4.4.4. Tromboksen A sintaza (TXAS)

Tromboksen A sintaza (TXAS; EC 5.3.99.5) je prvo detektovana u trombocitima, ali prisutna je i u drugim hematopoetskim ćelijama (monociti, makrofage, leukociti), i u različitim tkivima, prvenstveno u plućima, bubrezima, jetri, slezini, placenti i timusu (Wang i Kulmacz, 2002).

Gen za TXAS se nalazi na sedmom hromozomu, sadrži 13 egzona i 5 introna. Ekspresija TXAS je regulisana prvenstveno na transkripcionom nivou. Promotorni region sadrži *cis* elemente koji odgovaraju transkripcionom faktoru NF-E2 (*nuclear factor-erythroid 2*): TGATTCA, TATA i GATA-1 segment, AP-1 i AP-2 vezujuće mesto,

γ -interferonom (IFN γ) aktivirajući segment, segment osetljiv na glukokortikoide (GRE, *glucocorticoid response element*) i segment aktiviran stresom. Smatra se da region za vezivanje NF-E2 ima ključnu ulogu u regulaciji ekspresije TXAS, ali u različitim ćelijama i neki drugi faktori učestvuju u ovoj regulaciji (Ikeda i sar., 2000; Wang i Kulmacz, 2002; Nie i sar., 2004).

Ekspresija TXAS je povećana u različitim patološkim stanjima kao što su ateroskleroza (Gabrielsen i sar., 2010), kancer dojke (Li i sar., 2017), kancer debelog creva (Sakai i sar., 2006), kancer mokraćne bešike (Moussa i sar., 2005), kancer prostate (Nie i sar., 2004), kancer pluća (Cathcart i sar., 2011), papilarni kancer štitne žlezde (Kajita i sar., 2005). Smatrano je da je aktivnost TXAS kuplovana prvenstveno sa aktivnošću COX-1 (Caughey i sar., 2001), međutim, eksperimenti na ćelijama kancera prostate pokazuju da obe izoforme ciklooksigenaze obezbeđuju PGH₂ za TXAS (Nie i sar., 2004). Takođe, i u aterosklerotičnim plakovima je povećana ekspresija i COX-1 i COX-2, ali je uočena veća korelacija između ekspresije COX-1 i TXAS (Gabrielsen i sar., 2010).

TXAS pripada grupi enzima iz familije citohrom P450, koje sadrži hem kao kofaktor, a lokalizovana je na membrani endoplazmatičnog retikuluma (Wang i Kulmacz, 2002; Chen i sar., 2012b). Za razliku od većine enzima iz citohrom P450 familije, TXAS je izomeraza, a ne monooksigenaza (Chen i sar., 2012b). TXAS katalizuje reakciju siteze TXA₂ iz PGH₂. Osim TXA₂, u ekvivalentnim količinama kao produkti ove reakcije nastaju i malonildialdehid (MDA) i 12-hidroksi-5,8,10-heptadekatrienska kiselina (12-HHT).

TXAS sadrži 533 aminokiseline. Kristalna struktura ovog proteina nije još uvek dobijena, ali se na osnovu studija molekuskog modelovanja i ciljane mutageneze (*site-directed mutagenesis*) pretpostavlja da aminokiseline Cys480, Arg478, Asn110, Phe127 interaguju sa hemom, dok Ala408, Arg413, Glu433 i Arg410 interaguju sa supstratom. Prvi korak ove reakcije je interakcija kiseonika na devetom ugljenikovom atomu PGH₂ sa gvožđem iz hema. Pretpostavlja se da je vezivanje supstrata limitirajući korak ove reakcije. Cys480 predstavlja proksimalni ligand hema, usled čega je neophodan za aktivnost TXAS. Nakon homolitičkog raskidanja endoperoksidne veze, nastaju kiseonik- i ugljenik-centrirani radikali koji se izomerizuju do krajnjih proizvoda reakcije (Wang i sar., 1996, Wang i sar., 2001; Wang i Kulmacz, 2002, Sathler i sar., 2014).

4.5. Eksperimentalne metode za praćenje aktivnosti enzima uključenih u produkciju PGE₂ i TXA₂

Prostanoidi koji nastaju ciklooksigenaznim putem učestvuju u nizu inflamatornih i homeostatskih procesa. Zbog značaja koji imaju, razvijen je veliki broj metoda kojima se prati aktivnost enzima ciklooksigenaznog puta. Izbor metode zavisi od mnogo faktora, kao što su cilj ispitivanja, broj uzoraka, vreme ili cena istraživanja. U nastavku će detaljnije biti opisane *in vitro* metode za određivanje aktivnosti onih enzima koji su uključeni u produkciju PGE₂ i TXA₂ (tokom inflamacije).

Kada je reč o *in vivo* metodama, najčešće korišćeni testovi za potvrdu anti-inflamatorne aktivnosti nekog jedinjenja su karaginanom indukovani edem šape ili uha pacova i adjuvantom ili kolagenom indukovani artritis kod pacova, dok se orofacijalni formalinski test, test „grčenja“ indukovanih sirćetnom kiselinom, test tople ploče (*hot plate test*) i izmicanja repa (*tail flick test*) eksperimentalnih životinja koriste za određivanje analgetske aktivnosti koja takođe može da bude povezana sa inhibicijom produkcije prostanoida (Almeida Junior, 2019).

Inflamacija izazivana injekcijom karaginanom u zadnju desnu šapu pacova predstavlja model akutne inflamacije. Praćena je brzim razvojem bolne preosetljivosti, otoka i eritema, a posredovana oslobađanjem medijatora zapaljenja (histamina, serotoninina, tahikinina, bradikinina i prostaglandina), koji aktiviraju nociceptore i/ili povećavaju njihovu osetljivost u inflamiranom tkivu šape. Za praćenje hroničnih inflamacija često se primenjuju modeli adjuvant ili kolagen indukovanih artritisa kod eksperimentalnih životinja. Smatra se da adjuvantnom indukovani artritis poseduje mnoge karakteristike humanog reumatoidnog artritisa, te je jedan od najšire korišćenih modela za proučavanje patologije ove bolesti, kao i potencijalnih terapeutika (Rotelli i sar., 2003). Međutim, ovim metodama se često ispituje samo ukupno anti-inflamatorno delovanje, ali ne i da li mehanizam dejstva obuhvata inhibiciju ciklooksigenaznog puta.

COX-2 je prekomerno ekspresovana kod pacijenata obolelih od ulcerativnog kolitisa i Kronove bolesti, koje predstavljaju inflamatorna oboljenja debelog i tankog creva. Dekstran natrijum sulfatom indukovani kolitis je eksperimentalni model koji se najčešće koristi za proučavanje ove bolesti, kao i za *in vivo* ispitivanja uticaja nekog jedinjenja na aktivnost ciklooksigenaze (Cui i sar., 2010; Spisni i sar., 2015; Márquez-Flores i sar., 2016).

Poslednjih godina se *in vivo* ispitivanja enzima ciklooksigenaznog puta vrše i na životinjama kod kojih je indukovani kancer različitih organa, s obzirom da je poznata uloga COX-2 u nastanku i progresiji ovog oboljenja. Takođe, tokom poslednje dve decenije, mnoga saznanja o funkcijama ovih enzima dobijaju se i studijama na genetski modifikovanim životinjama (*knock-out* i *transgenic*), ali i na osnovu humanih bolesti uzrokovanih mutacijom gena ovih enzima.

4.5.1. Eksperimentalne metode za praćenje aktivnosti PLA₂

Kao što je ranije navedeno, reakcija katalizovana fosfolipazama predstavlja jednu od ključnih reakcija u produkciji eikozanoida, pa su mehanizmi ekspresije, funkcija i potencijalni inhibitori ovih enzima ispitivani u različitim model sistemima: na izolovanim enzimima i izolovanim rekombinantnim enzimima (Koeberle i sar., 2009), primarnim i kontinualnim ćelijskim linijama (neutrofil, Lee i sar., 1982; HUVEC, Ku i sar., 2014; makrofage, Naraba i sar., 1998; monociti, Karlsson i sar., 2010; U937 monociti, Kuroda i sar., 1997), transfekovanim ćelijama (Moon i sar., 2007; Yang i sar., 2013) ili *in vivo* (Yang i sar., 2013; Ku i sar., 2014;). Kada je reč o metabolizmu arahidonske kiseline, najčešće su proučavane sPLA₂ (grupe IIA, V, X), cPLA₂ α i iPLA₂ β . S obzirom da je tokom prethodnih dvadeset godina otkriven veliki broj novih izoformi PLA₂, u nekim od navedenih radova nije ni naznačeno koja izoforma PLA₂ je proučavana.

Jedan od prvih i najčešće korišćenih model sistema je PLA₂ iz zmijskog otrova, jer se smatra da ovaj enzim ima strukturne i funkcionalne sličnosti sa humanom sPLA₂ (Toyama i sar., 2014). Nakon izolovanja i prečišćavanja PLA₂ iz zmijskog otrova, inhibicija ovog enzima može da se određuje spektrofotometrijski i fluorometrijski. Prilikom spektrofotometrijskog testa, supstrat je 4-nitro-3-oktaniloksi-benzoeva kiselina, a prati se osobođena 4-nitro-3-hidroksi-benzoeva kiselina (Pereañez i sar., 2011; Toyama i sar., 2014; Novo Belchor i sar., 2017). Korišćenjem pirenom obeleženih fosfolipida kao supstrata (1-heksadekanoil-2-(1-pirendekanoil)-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol), aktivnost enzima se određuje merenjem fluorescencija oslobođene 1-pirendekaenske kiseline. U ovom slučaju, neophodno je uzeti u obzir potencijalne interakcije ispitivanih jedinjenja sa pirenom, jer, osim same reakcije hidrolize, i ove interakcije mogu znatno uticati na rezultate (Lättig i sar., 2007; da Silva i sar., 2009).

Eksperimenti na ćelijskim linijama kao model sistemima mogu istovremeno da pruže podatke o aktivnosti više izoformi PLA₂. Na primer, Naraba i saradnici (1998) su iz supernatanta lizata LPS-stimuliranih makrofaga određivali aktivnost sPLA₂ i cPLA₂. Prilikom određivanja aktivnosti sPLA₂, sPLA₂ je ekstrahovana u prisustvu sumporne kiseline, a cPLA₂ inhibirana, dok je tokom određivanja aktivnosti cPLA₂, sPLA₂ bila inhibirana dodatkom ditiotreitola. Hanekamp i Lehr (2012) su razvili metodu kojom se može određivati aktivnost cPLA₂ α iz supernatanta lizata trombocita svinje, nakon inhibicije iPLA₂ bromenol laktonom i inhibicije sPLA₂ dodatkom ditiotreitola. Supstrati se često nalaze inkorporirani u lipozomima, a najčešće korišćeni su 1-acil-2-[¹⁴C]arahidonil-*sn*-glicero-3-fosfatidiletanolamin (Naraba i sar., 1998), 1-stearoil-2-[¹⁴C]arahidonil-*sn*-glicero-3-fosfatidilholin (Karlsson i sar., 2010), 1-palmitoil-2-arahidonil-*sn*-glicero-3-fosfoholin i 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicerol (Koeberle i sar., 2009), 1-stearoil-2-arahidonil-*sn*-glicero-3-fosfatidilholin i 1,2 dioleol-*sn*-glicerol (Hanekamp i Lehr, 2012; Arnold i sar., 2015). Koncentracija neobeležene arahidonske kiseline može da se prati primenom hromatografskih tehnika (Koeberle i sar., 2009; Hanekamp i Lehr, 2012; Arnold i sar., 2015) ili primenom scintilacione tehnike (Karlsson i sar., 2010).

4.5.2. Eksperimentalne metode za praćenje aktivnosti COX-1 i COX-2

Varijable između *in vitro* i *ex vivo* testova za određivanje inhibicije ciklooksigenaza obuhvataju prvenstveno: poreklo enzima, poreklo supstrata (endogena ili egzogena arahidonska kiselina), stimuluse kojima se indukuje inflamacija, kao i tehnike koje se koriste za detekciju krajnjih proizvoda ciklooksigenaznog puta. Takođe, između metoda variraju i koncentracije inhibitora, enzima, supstrata, aktivatora, kao i vreme inkubacije, usled čega se u različitim eksperimentima mogu dobiti različiti rezultati.

Na osnovu izvora enzima možemo da razlikujemo testove u kojima se koriste:

1. Izolovani i prečišćeni humani ili životinjski enzimi: najčešće se koriste COX-1 enzim izolovan iz ovčijih semenih vezikula i humani rekombinantni COX-2 enzim, koji su komercijalno dostupni (Cho i sar., 2004; O'Leary i sar., 2004; Koeberle i sar., 2008, Koeberle i sar., 2009).

2. Komercijalno dostupne ćelijske linije (humane i animalne): najčešće se koriste ćelijske linije krvi (Chen i sar., 2001; Raso i sar., 2001; Chen i sar., 2007), kancera (Banerjee i sar., 2002; O'Leary i sar., 2004; Xiao i sar., 2011), hrskavice (Haseeb i sar., 2013) i sinovijalne membrane (Lin i sar., 2003), jer je tokom inflamacije zabeležena povišena ekspresija COX-2 upravo u ovim ćelijama, uz konstitutivno prisutnu ekspresiju COX-1. Takođe, široku primenu imaju i transfekovane ćelije (Takano i sar., 2000).

3. Puna krv ili ćelije izolovane iz krvi životinja, zdravih donora ili pacijenata obolelih od određene bolesti: najčešće se izoluju monociti (makrofage), limfociti i neutrofili, koji mogu biti izvor i COX-1 i COX-2 enzima, i trombociti, samo kao izvor COX-1 (Laufer i sar., 1999; Beara i sar., 2010; Karlsson i sar., 2010; Ribeiro i sar., 2014). Ovi testovi u kojima se koristi krv ili primarne ćelije iz krvi najviše podsećaju na *in vivo* uslove, a ubrajaju se u *ex vivo* testove.

Upotrebom izolovanih enzima se veoma brzo dobijaju podaci o aktivnosti potencijalnih inhibitora. Nedostatak ovog modela ogleda se u tome što se dobijaju informacije samo o interakcijama inhibitora sa enzimom, ali ne i o interakcijama sa drugim biomolekulima (npr. proteinima plazme), intraćelijskoj i međućelijskoj signalnoj komunikaciji. Ukoliko se radi na komercijalnim ćelijskim linijama (*in vitro*), mogu se uočiti podaci o difuziji jedinjenja kroz ćelijsku membranu i signalnim kaskadama unutar ćelije, ali ne i o međućelijskoj signalnoj komunikaciji. Takođe, komercijalne ćelijske linije su većinom ćelije kancera, pri čemu postoji izvesna nedoumica da li i u kolikoj meri zadržavaju fenotipske karakteristike (zdravih) ćelija u organizmu. Kada se koriste ovi biološki sistemi, neophodno je potvrditi da ciljani enzim zadržava iste karakteristike koje ima u zdravoj ćeliji. Takođe, često se koriste različite vrste ćelijskih linija za proučavanje uticaja na COX-1 i COX-2, što otežava poređenje dobijenih rezultata. Ipak, ovi modeli su veoma korisni, jer se relativno lako i brzo dobijaju preliminarni podaci o aktivnosti određenog jedinjenja ili ekstrakta, kao što su podaci o inhibitornoj koncentraciji, kinetici i intraćelijskim mehanizmima delovanja. Testovi na ćelijama direktno izolovanim iz krvi (*ex vivo*) delom prevazilaze ove nedostatke, jer ukoliko se testovi za određivanje inhibicije COX-1 i COX-2 izvode na ćelijama krvi istog pacijenta, dobijeni rezultati mogu da se porede. Međutim, nesigurnost u poređenju rezultata dobijenih u radu sa ćelijama različitih donora je izvesna, jer postoji mogućnost razlike u

metabolizmu u i homostatskoj ekspresiji enzima poreklom iz različitih individua. Za razliku od komercijalnih ćelijskih linija, ćelije direktno izolovane iz krvi nisu pogodne kao model sistem za rutinske analize, jer je sam proces izolovanja vremenski zahtevan, skup, a ćelije su veoma osjetljive. Testovi koji se rade na punoj krvi (*ex vivo*) prevazilaze većinu navednih nedostataka drugih model sistema, jer se uzimaju u obzir interakcije potencijalnih inhibitora sa proteinima plazme, kao i međusobne ćelijske interakcije, a vremenski su manje zahtevni od testova na izolovanim krvnim ćelijama. Dodatna prednost se ogleda u tome što je moguća oralna primena odgovarajućih inhibitora (*in vivo*), pa se nakon uzorkovanja krvi mogu dobiti i informacije o metabolizmu inhibitora. Najveće nedostatak testova na humanoj punoj krvi i na primarnim krvnim ćelijama je etičke prirode, jer je nepohodan veliki broj volontera, pri čemu se u današnje vreme i zavodi za transfuziju susreću sa velikim deficitom dobrovoljnih davaoca krvi za klinički upotrebu (Laufer i sar., 2008; Perrone i sar., 2010).

Inflamacija je *in vivo* indukovana mnogobrojnim proinflamatornim medijatorima, i svi oni, pojedinačno ili u kombinaciji, mogu da se koriste za indukciju inflamacije u *in vitro* uslovima.

Kao što je ranije rečeno, COX-1 je u većini tkiva konstantno ekspresovana izoforma enzima. Međutim, zabeležena je povećana ekspresija ovog enzima u prisustvu različitih stimulusa (Tabela 4.2.), a obično tokom diferencijacije ćelija (Tanabe i Tohnai, 2002).

Tabela 4.2. Stimulusi korišćeni za indukciju ekspresije i/ili aktivaciju enzima COX-1

Ćelijska linja/tkivo	Aktivator	Referenca
Monociti/makrofage	Retinoinska kiselina	Jiang i sar., 2003b
	Egzogena arahidonska kiselina	Demasi i sar., 2000
	Forbol 12- miristat 13-acetat (PMA)	Jiang i sar., 2003a
	4-(Metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanon (komponenta duvanskog dima)	Rioux i Castonguay, 2000
	Kalcijumova jonofora A23187 - IL-4	Demasi i sar., 2000 Shay i sar., 2017
Ćelijska linija neuroblastoma	Retinoinska kiselina Kortikosteroidi (deksametazon)	Schneider i sar., 2001
Ćelijska linija humanih megakarioblasta CMK	PMA	Ueda i sar., 1997
Ćelijska linija humanih megakarioblasta MEG-01	PMA	DeLong i Smith, 2005
Ćelijska linija humanih fibroblasta pluća	TGFβ	Diaz i sar., 1998
Humana krv, izolovani trombociti	Kalcijumova jonofora A23187 - kalcimicin	Laufer i sar., 1998; Beara i sar., 2010; Ribeiro i sar., 2014

Ekspresiju COX-2 indukuju razni endogeni i egzogeni faktori kao što faktori rasta, hormoni, citokini, onkogeni, žučne kiseline, LPS, PMA, UV zračenje i mehaničko naprezanje. U većina slučajeva ekspresija COX-2 je povećana samo privremeno (Marks i Furstenberg, 1999), a u Tabeli 4.3. je dat pregled najčešće korišćenih aktivatora inflamacije, odnosno ekspresije COX-2.

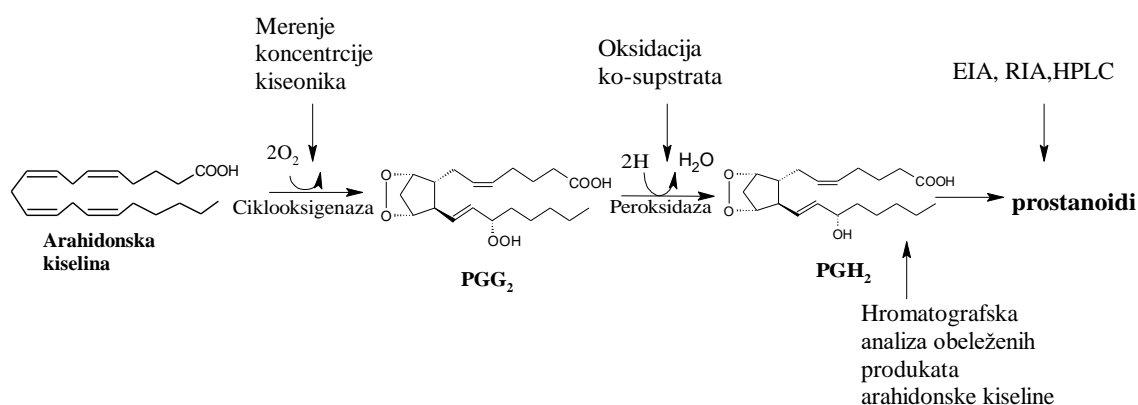
Tabela 4.3. Indukcija enzima COX-2 u različitim ćelijskim linijama

Ćelijska linija/tkivo	Aktivator	Referenca
Epidermalni keratinociti <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i>	UV zračenje	Tanaka i sar., 2004; Kang i sar., 2009b
Ćelijska linija humanih endotelnih ćelija	IL-1 β	Caughey i sar., 2001
Hematopoetske ćelije (najčešće monociti/makrofage)	Lipopolisaharid (LPS)	Raso i sar., 2001; Jiang i sar., 2003a; Chen i sar., 2007; Ribeiro i sar., 2014
	TNF α / TNF	Takada i sar., 2004
	LPS+PMA	Karlsson i sar., 2010
	LPS+ Zimosan	Karlsson i sar., 2010
Ćelije jetre (Chang liver cell line)	Smeša citokina (IL-1 β , TNF α i IFN γ)	García-Mediavilla i sar., 2007
Ćelijska linija humannog adenokarcinoma pluća A549	Smeša citokina (IL-1 β , TNF α , IFN γ)	Banerjee i sar., 2002
	LPS	Koeberle i sar., 2009
Ćelijska linija humanog kancera kolona (Caco2)	IL-1 β	O'Leary i sar., 2004
Ćelijska linija humanog epitela dojke	PMA	Kundu i sar., 2003
Fibroblasti	IL-1 β	Lin i sar., 2003; Yoon i sar., 2013
Hondrociti	IL-1 β	Haseeb i sar., 2013

Smanjena produkcija prostanoida u korišćenim model sistemima može biti posledica inhibicije ekspresije odgovarajućih enzima, inhibicije sinteze proteina ili inhibicije enzimske aktivnosti.

Northern blot tehnika (Jiang i sar., 2003b) i RT- qPCR (Laufer i sar., 1999; Banerjee i sar., 2002; Lin i sar., 2003; Chen i sar., 2007) se obično koriste za analizu ekspresije mRNA enzima ciklooksigenaznog puta, dok se nivo ovih proteina u uzorku uglavnom detektuje korišćenjem *Western blot* tehnike (Laufer i sar., 1999; Raso i sar., 2001; Banerjee i sar., 2002; Lin i sar., 2003; Jiang i sar., 2003a; Jiang i sar., 2003b) ili protočne citometrije (Kats i sar., 2013).

Razvijeno je nekoliko metoda kojima se može pratiti aktivnost ciklooksigenaze (Slika 4.4.).



Slika 4.4. Metode određivanja aktivnosti ciklooksigenaze

(prilagođeno iz Petrović i Murray, 2010)

Moguće je pratiti odvojeno ciklooksigenaznu i peroksidaznu aktivnost. Međutim, smatra se da je celokupna aktivnost ciklooksigenaze limitirajući korak u sintezi

prostanoida, pa se ona najčešće određuje posredno, merenjem produkcije prostanoidea. Uglavnom se određuje nivo PGE₂ koji se smatra glavnim proizvodom ciklooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline, pri čemu se često dodaju inhibitori TXAS kako bi se sprečilo nastajanje TXA₂ i metabolizam usmerio ka sintezi PGE₂ (Petrović i Murray, 2010).

S obzirom da sinteza prostanoidea iz arahidonske kiseline započinje adicijom dva molekula kiseonika na arahidonsku kiselinu, prva katalitička aktivnost ovog enzima, peroksidacija, može da se određuje indirektno, merenjem potrošnje kiseonika u reakcionoj smeši. Nakon dodatka egzogene arahidonske kiseline, koja se oksiduje do PGG₂, koncentracija kiseonika opada, što se meri pomoću polarografske kiseonične elektrode. Ova metoda se može koristiti za praćenje kinetike enzima, a nedostatak je što je potrebna velika količina enzima, te nije pogodna za analizu većeg broja uzoraka (Perrone i sar., 2010; Petrović i Murray, 2010).

Redukcija PGG₂ u PGH₂ može indirektno da se prati preko ko-oksidacije različitih supstrata (10-acetil-3,7-dihydrofenoksazina (ADHP; Sarnpitak i sar., 2014), luminola ili *N,N,N',N'*-tetrametil-*p*-fenilendiamina (TMPD; Cho i sar., 2004; O'Leary i sar., 2004), određivanjem koncentracija njihovih produkata. ADHP se ko-oksiduje do crvenog, fluorescentnog resorufina, čija se eksitacija prati na talasnoj dužini od 530–540 nm, a emisija na 590–600 nm. Oksidacijom TMPD nastaje plavi produkt čija se apsorbancija meri na 590 nm (Petrović i Murray, 2010).

Obeležena (¹⁴C-1) arahidonska kiselina je često korišćena za direktno određivanje aktivnosti COX *in vitro*. Nakon reakcije, hromatografijom na koloni su razdvajani prostanoidei od nemetabolisane arahidonske kiseline i merena je radioaktivnost u uzorcima. Međutim, danas je smanjena upotreba radiohemijskih metoda i ovaj pristup se uglavnom izbegava (Petrović i Murray, 2010).

Kao što je ranije navedeno, određivanje ciklooksigenazne aktivnosti se najčešće zasniva na detekciji nastalih prostanoidea. Nivo prostanoidea se najčešće određuje primenom imunoloških metoda: enzimskih imuno metoda (EIA, *enzyme immuno assay*; Raso i sar., 2001; Banerjee i sar., 2002; Jiang i sar., 2003a; Jiang i sar., 2003b; Chen i sar., 2007; Ribeiro i sar., 2014) i radio-imunih metoda (RIA, *radio immuno assay*; Alanko i sar., 1995; Demasi i sar., 2000; Hämäläinen i sar., 2011), uz upotrebu komercijalno dostupnog kompleta po uputstvu proizvođača. Obe metode se zasnivaju na kompeticiji obeleženih prostanoidea poznate koncentracije i neobeleženih prostanoidea, prisutnih u uzorku, za vezivanje za antigene. Primenom obe metode se mogu detektovati niske koncentracije prostanoidea, ali EIA metoda ima prednost jer se koriste mnogo manje zapremine uzorka, a i enzimom (najčešće acetilholinesterazom) obeležena jedinjenja su stabilnija od radiohemijski obeleženih jedinjenja, čijoj smanjenoj upotrebi se svakako teži zbog štetnih uticaja na zdravlje i životnu okolinu (Lianos, 1999). Obe metode su veoma selektivne i specifične za jedan prostanoid, koji se može određivati direktno iz bioloških uzoraka (supernatant ćelije, plazma, serum, urin), jer ne dolazi do interferencije sa drugim jedinjenjima. Međutim, ovako visoka selektivnost može da bude i nedostatak, jer ukoliko se prati više jedinjenja, neophodan je odgovarajući komplet za svako jedinjenje, što povećava cenu i vreme izvođenja eksperimenta. Nivo prostanoidea može da

se određuje i primenom hromatografskih tehnika, prvenstveno tečnom hromatografijom visokih performansi (HPLC) kuplovanom sa različitim detektorima: HPLC-UV (Koeberle i sar., 2009) ili HPLC-MS/MS (Takabatake i sar., 2002; Frohberg i sar., 2006; Blewett i sar., 2008; Beara i sar., 2010). Najveća prednost hromatografskih tehnika ogleda se u mogućnosti simultanog detektovanja različitih prostanoida u velikom broju uzoraka. Naime, primenom savremene UPLC-MS/MS (*Ultra-high performance liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry*) tehnike moguće je istovremenom kvantifikovati sadržaj više desetina eikozanoida i njihovih metabolita iz kompleksnih bioloških uzoraka kao što su krv i plazma (Maione i sar., 2016; Du i sar., 2020).

4.5.3. Eksperimentalne metode za praćenje aktivnosti PGES

Od otkrića tri izoforme PGES i uloge mPGES-1 u produkciji proinflammatoryh PGE₂, ovaj enzim je postao predmet intenzivnih istraživanja u cilju otkrivanja dodatnih uloga i inhibitora, odnosno potencijalno bezbednijih anti-inflamatornih lekova. Model sistem u najvećem broju *in vitro* i *ex vivo* istraživanja predstavljaju ćelije krvi (puna krv) ili ćelijske linije, kao što su na primer ćelijska linija raka grlića materice HeLa (Wobst i sar., 2008), ćelijska linija mišijih makrofaga RAW264.7 (Wang i sar., 2007), ćelijska linija humang adenokarcinoma pluća A549 (Koeberle i sar., 2009; Bauer i sar., 2012; Schaible i sar., 2013; Larsson i sar., 2019), odnosno mikrozomalne frakcije ovih ćelija, ili izolovani rekombinantni enzimi (Larsson i sar., 2019).

U intaktnim ćelijama može da se analizira sposobnost nekog jedinjenja da inhibira ekspresiju PGES ili produkciju PGE₂. Međutim, sniženi nivo PGE₂ u intaktnim ćelijama može da potiče od inhibicije svakog enzima uključenog u sintezu PGE₂ (PLA₂, COX-1/2, PGES), dok inhibicija produkcije PGE₂ u mikrozomalnim frakcijama zavisi samo od inhibicije PGES. U testovima na intaktnim ćelijama i mikrozomalnim frakcijama, koriste se isti aktivatori kao i pri određivanju ciklooksigenazne aktivnosti: LPS (Koeberle i sar., 2009; Hämäläinen i sar., 2011; Larsson i sar., 2019), Il-1β (Koeberle i sar., 2009; Bauer i sar., 2012; Schaible i sar., 2013; Larsson i sar., 2019; Toda i sar., 2020), ili smeša Il-1β i TNFα (Wobst i sar., 2008), dok se u testovima na izolovanim enzimima kao supstrat koristi PGH₂ (Karlsson i sar., 2010; Leclerc i sar., 2013; Larsson i sar., 2019). Kvantifikacija proizvoda može da se vrši primenom HPLC tehnike (Koeberle i sar., 2008; Wobst i sar., 2008; Koeberle i sar., 2009; Bauer i sar., 2012; Schaible i sar., 2013; Larsson i sar., 2019; Toda i sar., 2020), EIA testa (Karlsson i sar., 2010; Larsson i sar., 2019) ili posredno, spektrofotometrijski (Leclerc i sar., 2013; Larsson i sar., 2019).

Od prisutnih PGES, mPGES-1 predstavlja najatraktivniju metu farmakoloških ispitivanja, pa se veoma često koriste i izolovani rekombinantni humani enzimi mPGES-1, kako bi se utvrdio mehanizam vezivanja inhibitora i potencijal inhibicije. Tokom poslednje dve decenije razvijeno je nekoliko spektrofotometrijskih, fluorometrijskih, imunoloških i hromatografskih metoda za ispitivanje velikog broja uzoraka (*high-throughput screening*). Neke od njih su opisane u nastavku.

Merenje apsorbancije (340 nm) NADH koji nastaje u reakciji NAD⁺ (nikotinamid adenin dinukleotid) zavisne oksidacije PGE₂ od strane 15-PGDH. Supstrat za mPGES-1

može da bude *in situ* generisan PGH₂, koji se dobija neposredno pre samog testa delovanjem COX-2 na arahidonsku kiselinu, ili komercijalno dostupan PGH₂ (Percival, 2003).

Merenje apsorbancije (530 nm) konjugata MDA i 2-tiobarbiturne kiseline (TBA). PGH₂ je supstrat za humanu ili mišiju mPGES, a reakcija se stopira dodatkom FeCl₂ i limunske kiseline, usled čega se neizreagovali PGH₂ konvertuje u 12-HHT i MDA, koji sa TBA gradi ružičasto obojeni kompleks (Spahiu i sar., 2011; Leclerc i sar., 2013; Larsson i sar., 2019).

Merenje fluorescentnog signala (*homogenous time-resolved fluorescence (HTRF)*) nastalog između HTRF donora i akceptora. Koristi se rekombinantina humana mPGES-1 i PGH₂ kao supstrat. Reakcija se prekida dodatkom HCl i SnCl₂ (prevodi preostali PGH₂ do PGF_{2α}). PGE₂ se vezuje za anti-PGE₂ obeleženo antitelo (HTRF donor), što narušava interakciju između HTRF donora i akceptora (PGE₂-d2). Fluorescentni signal se prati na 620 i 665 nm, a intenzitet signala je obrnuto proporcionalan količini PGE₂ (Goedken i sar., 2008).

Merenje fluorescencije rezofurina koji nastaje redukcijom resazurina u prisustvu diaforaze, u reakciji koja je kuplovana se reoksidacijom NADH nastalog delovanjem 15-PGDH. Prednost ove metode u odnosu na spektrofotometrijsku metodu kojom se određuje NADH je smanjeni signal interferirajućih komponenti. U ovoj metodi se istovremeno dodaju COX-2, mPGES-1, 15-PGDH, njihovi odgovarajući kofaktori (hemin, glutation i NAD⁺), diaforaza i resazurin, a reakcija započinje dodatkom arahidonske kiseline, pri čemu se PGH₂ generiše *in situ*. Ova metoda trenutno ima najbolju propusnu moć, jer je optimizovana za mikrotitar ploče sa 1536 otvora (Leveridge i sar., 2012).

Praćenje fluorescencije (emisija na 462 nm, ekscitacija na 340 nm) NADH koji nastaje u reakciji NAD⁺ zavisne oksidacije PGE₂ od strane 15-PGDH. Reakciona smeša sadrži mPGES-1, 15-PGDH, pufer, fosfomolibdensku kiselinu, glutation, NAD⁺, ditiotritol, a reakcija se inicira dodatkom PGH₂. Autori smatraju da dodatak fosfomolibdenske kiseline obezbeđuje robusniju metodu u odnosu na metodu Percival-a iz 2003. godine, jer sprečava spontanu razgradnju PGH₂ (Choi i sar., 2010).

Imunološke metode (EIA), u kojima se koristi rekombinantina humana mPGES-1 i PGH₂ kao supstrat. Reakcija se prekida dodatkom HCl i SnCl₂, a nastali PGE₂ se kvantifikuje primenom EIA, pri čemu je test optimizovan za mikro-ploče sa 384 otvora (Massé i sar., 2005).

Hromatografske metode, koje uključuju primenu HTMS sistema (*RapidFire high-throughput mass spectrometry*). Reakcionu smešu čine COX-2, mPGES-1, hemin, glutation u odgovarajućem puferu, reakcija započinje dodatkom arahidonske kiseline, a zaustavlja se dodatkom FeCl₃ i limunske kiseline. Ovom metodom se istovremeno prati koncentracija preostalog supstrata (prevedenog u 12-HHT) i nastalog proizvoda PGE₂ (Leveridge i sar., 2012)

Naravno, kako bi se dobili što relevantniji podaci pre *in vivo* studija, neophodno je kombinovati testove na izolovanim enzimima i na ćelijskim linijama, kao i testove u punoj krvi, kao složenijem *in vitro (ex vivo)* model sistemu.

U pogledu *in vivo* ispitivanja, veliku prepreku predstavljala je razlika između humanog mPGES-1 i mPGES-1 enzima najčešće korišćenih eksperimentalnih životinja, pacova i miševa. Ove poteškoće su prevaziđene upotrebom morskog praseta ili genetski modifikovanih miševa (*knock in*) kojima je ubačen gen za humani mPGES (Koeberle i Werz, 2018; Bergqvist i sar., 2020).

4.5.4. Eksperimentalne metode za praćenje aktivnosti TXAS

U *in vitro* (*ex vivo*) ispitivanjima, kao izvor enzima TXAS i biološki sistem u kom se produkuje TXA₂, najčešće se koriste krv (Bauer i sar., 2012), plazma bogata trombocitima (*platelet rich plasma*; Tzeng i sar., 1991; Wu i sar., 2007; Lescano i sar., 2018) i izolovani trombociti humanog (Moon i sar., 2000; Beara i sar., 2010) ili životinjskog porekla (Moon i sar., 2000; Son i sar., 2004; Lee i sar., 2013; Son i sar., 2014). Takođe, mogu da se koriste i kontinualne ćelijske linije humanih endotelnih ćelija HUVEC (Caughey i sar., 2001), humanih leukemijskih monocita U937 (Penglis i sar., 2000), peritonealne makrofage pacova (Naraba i sar., 1998), RAW 264.3 mišije makrofage (Son i sar., 2014) i humane sinovijalne ćelije (Takabatake i sar., 2002).

Najčešći pristup koji se koristi za ispitivanje uticaja različitih jedinjenja na produkciju TXA₂ je određivanje stepena agregacije trombocita, zbog značajne uloge koju TXA₂ ima u ovom procesu. Stepenu agregacije trombocita se uglavnom određuje turbidimetrijski, a za indukciju agregacije mogu da se koriste arahidonska kiselina (Tzeng i sar., 1991; Moon i sar., 2000; Son i sar., 2004; Crescente i sar., 2009; Lescano i sar., 2018), jonofora A23187 (Munoz i sar., 2009), adrenalin (Tzeng i sar., 1991; Wu i sar., 2007), kolagen (Tzeng i sar., 1991; Moon i sar., 2000; Son i sar., 2004; Son i sar., 2014), trombin (Moon i sar., 2000), adenozin difosfat (ADP; Tzeng i sar., 1991; Guglielmone i sar., 2005), PAF (Tzeng i sar., 1991) i U44619 (sintetički analog PGH₂ i agonist TP receptora; Tzeng i sar., 1991; Moon i sar., 2000; Son i sar., 2004; Son i sar., 2014).

Kolagen (Guglielmone i sar., 2005; Son i sar., 2014), arahidonska kiselina (Tzeng i sar., 1991; Guglielmone i sar., 2005; Lescano i sar., 2018), jonofora A23187 (Naraba i sar., 1998; Beara i sar., 2010) i LPS (Naraba i sar., 1998; Bauer i sar., 2012; Son i sar., 2014) se koriste u testovima u kojima se ispituje uticaj jedinjenja na produkciju TXA₂, nezavisno od agregacije trombocita. Naime, pored inhibicije produkcije TXA₂, smanjena agregacija trombocita može biti uslovljena i drugim mehanizmima, kao što je inhibicija PLC ili protein kinaze signalne kaskade, inhibicija oslobađanja Ca²⁺, povećanje koncentracije ćelijskih glasnika cAMP ili cGMP (Nardini i sar., 2007). Takođe, s obzirom na činjenicu da je TXAS poslednji enzim u procesu sinteze TXA₂ iz arahidonske kiseline, smanjenje produkcije ovog jedinjenja, osim inhibicijom TXAS može biti uslovljeno i inhibicijom prethodnih enzima u nizu, ciklooksigenaze i fosfolipaze A₂. Smanjena produkcija TXA₂ je često pripisivana inhibiciji COX-1, bez razmatranja potencijalne inhibicije drugih enzima, jer je poznatno da jedan od najčešće korišćenih antiaterogenih lekova, aspirin, deluje kao inhibitor COX-1 u trombocitima (Crescente i sar., 2009; Lescano i sar., 2018). Potencijalna inhibicija TXAS se može odrediti kada se trombociti (izvor samo COX-1, a ne i COX-2) pretretiraju

indometacinom ili sa SC-560 (COX ili COX-1 inhibitor), a zatim se doda PGH₂ (supstrat TXAS) ili agonist trombinskog receptora, i prati se produkcija TXA₂ (Son i sar., 2004; Leclerc i sar., 2013; Son i sar., 2014). Takođe, aktivnost TXAS može da se ispituje i u mikrozomalnim frakcijama trombocita (Moon i sar., 2000; Lee i sar., 2013; Ro i sar., 2015) ili nekih drugih ćelijskih linija, na primer makrofaga (Naraba i sar., 1998).

S obzirom da TXA₂ ima izuzetno kratak poluživot i da se neenzimskom hidrolizom metaboliše u stabilan derivat tromboksan B₂ (TXB₂), u testovima se prati zapravo koncentracija TXB₂. Za određivanje koncentracije TXB₂ koriste se RIA (Tzeng i sar., 1991; Caughey i sar., 2001), EIA (Son i sar., 2004; Crescente i sar., 2009; Bauer i sar., 2012; Lescano i sar., 2018) ili hromatografske tehnike (Takabatake i sar., 2002; Frohberg i sar., 2006; Blewett i sar., 2008; Beara i sar., 2010). U *in vivo* ispitivanjima, nakon oralne primene potencijalnog inhibitora, prate se metaboliti TXA₂ (11-dehidro-TXB₂) u krvi i u urinu.

4.5.5. Odabrani model sistem - U937 monociti i makrofage

Monociti, klasa leukocita, mogu da se diferenciraju u dentritske ćelije ili u makrofage. Na osnovu receptora za citokine koji su ekspresovani na površni, razlikuju se tri osnovne grupe humanih monocita: CD14⁺⁺CD16⁻ (klasični monociti), CD14⁺⁺CD16⁺ (intermedijerni monociti) i CD14⁺CD16⁺⁺ (neklasični monociti). Zahvaljujući ovim receptorima monociti migriraju do mesta inflamacije, a kada uđu u tkiva diferenciraju se u makrofage. Smatra se da humani klasični i intermedijerni monociti učestvuju u inflamaciji, dok neklasični monociti „patroliraju“ krvotokom, odnosno tragaju za eventualno prisutnim patogenima ili oštećenjima endotelne površine. Pored neutrofila, ove ćelije su ključne za imuni odgovor, proizvode reaktivne kiseonične vrste, azot-monoksid i proinflamatorne medijatore citokine i prostaglandine. Međutim, monociti istovremeno mogu da doprinesu i razvoju ateroskleroze, tumora, fibroze jetre i neurodegenerativnih bolesti (Karlmark i sar., 2012; Italiani i Boraschi, 2014).

Tokom diferencijacije do makrofaga, monociti prolaze kroz niz morfoloških promena, od kojih adherentnost predstavlja osnovni pokazatelj da su monociti sazreli u makrofage. Osim iz monocita, makrofage mogu da nastaju i u fazi prenatalnog razvoja (iz jetre i žumančane kese). U različitim tkivima makrofage imaju različite nazive (alvelarne makrofage, histociti, Kuperove ćelije, Langerhansove ćelije, mikroglia ćelije, osteoklasti), ali imaju istu funkciju. Neophodni su za razvoj i održavanje pravilne funkcije tkiva, održavanje homeostaze, imuni odgovor, zarastanje rana, započinjanje i terminaciju inflamacije. U zavisnosti od okruženja, makrofage mogu da polarizuju u klasične, proinflamatorne M1 makrofage ili alternativne, anti-inflamatorne, M2 makrofage. M1 makrofage na svojoj površini prezentuju antigene MHC, ko-stimulatore (CD80, CD86) i adhezione molekule (CD169), a sekretuju TNF α i proinflamatorne citokine (IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23) kako bi privukli što više ćelija imunog sistema na mesto infekcije. Dodatno, delovanjem matriks metaloproteinaza i produkcijom azot-monoksida i reaktivnih kiseoničnih vrsta, M1 makrofage doprinose oštećenju tkiva. Nasuprot tome, M2 makrofage ispoljavaju imunosupresivni efekat, vrše reparaciju tkiva, a tokom ovog procesa proizvode IL-10, TGF β , arginazu I, CD 206. U nekim slučajevima

moгу da ispoljavaju i suprotne efekte, na primer smatra se da M1 makrofage deluju supresivno, dok M2 stimulišu razvoj tumora. U nekim patološkim stanjima (npr. ateroskleroza), prisutna su oba fenotipa makrofaga, a usled različitih stimulusa i mikrookruženja, jedan fenotip može da se transformiše u drugi (Italiani i Boraschi, 2014, Lee, 2019).

Najčešći stimulusi koji se u *in vitro* uslovima koriste za diferencijaciju monocita u makrofage su PMA, derivati vitamina D, retinoinska kiselina, interferon ili različiti citokini (Garrelds i sar., 1999; Valdés López i Urcuqui-Inchima, 2018). U eksperimentalnim, *in vitro* uslovima, polarizacija u M1 makrofage se indukuje dodatkom LPS, TNF α , IFN γ ili faktora stimulacije kolonija granulocita i makrofaga (GM-CSF), a u M2 pomoću IL-4, IL-10, IL-13, TGF β , faktora stimulacije kolonija makrofaga (M-CSF) ili glukokortikoida. U zavisnosti od stimulusa, razlikuju se četiri grupe formiranih M2 makrofaga: M2a, M2b, M2c i M2d (Italiani i Boraschi, 2014; Lee, 2019; Kuno i sar., 2020)

U eksperimentalnom radu u okviru ove doktorske disertacije, kao model sistem je korišćena ćelijska linija humanih monocita U937, koja je delovanjem PMA transformisana u makrofage. Inflamacija je izazvana dodatkom LPS, čime je uslovljen proinflamatorni, M1 fenotip makrofaga. LPS je polisaharid ćelijskog zida gram negativnih bakterija. Egzogena arahidonska kiselina upotrebljena je kao supstrat.

U937 ćelijska linija humane mijeloidne leukemije je izolovana iz histiocitnog limfoma tridesetsedmogodišnjeg muškarca. U937 monociti poseduju mnoge karakteristike zdravih monocita i predstavljaju jednu od najčešćih korišćenih kontinualnih ćelijskih linija monocita u biomedicinskim istraživanjima. U937 ćelije su nediferencirani, neaktivni monociti, usled čega predstavljaju dobar model sistem za praćenje aktivacije i diferencijacije monocita (Chanput i sar., 2015, Chimal-Ramirez i sar., 2016). Takođe, često se koriste kao model sistemi prilikom proučavanja mehanizama interakcija monocita sa endotelnim i drugim ćelijama inflamatornog odgovora (Chanput i sar., 2015). U velikom broju studija, upravo ova ćelijska linija je korišćena za proučavanje metabolizma arahidonske kiseline u monocitima (Rioux i Castonguay, 2000; Jiang i sar., 2003a; Jiang i sar., 2003b)

Ove ćelije su dobar model sistem za praćenje produkcije PGE₂, jer u njima može da nastane velika količina ovog proinflamatornog medijatora (Ricciotti i FitzGerald, 2011). Nakon trombocita, najveća količina TXA₂ se produkuje u monocitima i makrofagama, što ove ćelije čini dobrim model sistemom za ispitivanje uticaja na sintezu TXA₂ (Smyth, 2010).

U netretiranim monocitima ispoljena je samo COX-1, a ekspresija COX-2 se može indukovati dejstvom LPS-a (Riendeau i sar., 1997; Demasi i sar., 2000; Penglis i sar., 2000; Kato i sar., 2001). Pod dejstvom PMA, dolazi do diferencijacije U937 monocita u makrofage i do ekspresije COX-2, kao i blagog povećanja ekspresije konstitutivne COX-1 (Jiang i sar., 2003a; Jiang i sar., 2003b). Prilikom stimulacije makrofaga proinflamatornim stimulusima, kao što su TNF α , IL-1 i LPS, dolazi do povećanja ekspresije COX-2 (Tabela 4.3.). Korišćenjem istog model sistema za ispitivanje uticaja i na COX-1 i na COX-2, mogu se porediti efekti ispitivanog jedinjenja na ove enzime i tokom različitih fizioloških procesa, jer se prevazilaze nedostaci koji potiču od različitih

eksperimentalnih uslova, kao što su ćelije različitog porekla, tip stimulacije i sl. (Demasi i sar., 2000; Kato i sar., 2001)

Pri stimulaciji ćelija LPS-om, aktiviraju se bar dve signalne kaskade kojima se podstiče ekspresija inducibilnih enzima uključених u produkciju PGE₂ i TXA₂ (COX-2, PLA₂, mPGES-1; Uematsu i sar., 2002; Kang i sar., 2007, Yarla i sar., 2016). Jedna signalna kaskada je NF-κB, a druga uključuje mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK, *mitogen-activated protein kinase*).

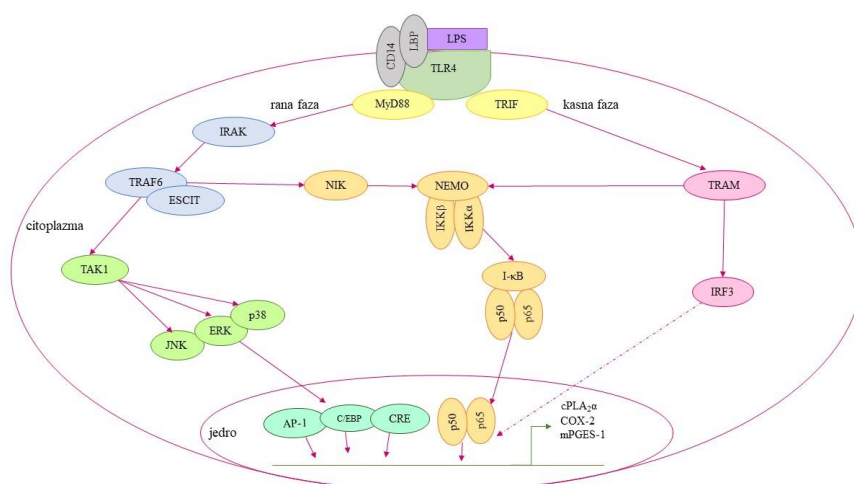
Postoji pet definisanih članova familije NF-κB proteina u ćelijama sisara: NF-κB 1 (p50), NF-κB 2 (p52), RelA (p65), RelB i c-Rel. Ovi proteini se u citoplazmi nalaze u homodimernom ili heterodimernom obliku (najčešće dimer p50/p65), vezani za inhibitorni protein I-κB (I-κBα, I-κBβ, I-κBε, p100 i p105), usled čega su u inaktivnom stanju. Aktiviraju se fosforilacijom I-κB, delovanjem IKK (I-κB kinaze). IKK sadrži dve katalitičke (IKKα i IKKβ) i jednu regulatornu podjedinicu IKKγ (ili NEMO, *NFκB essential modifier*), a fosforilaciju I-κB vrši fosforilisana IKKβ podjedinica. Nakon fosforilacije, dolazi do odvajanja, ubikvitinacije i degradacije I-κB, a NF-κB se premešta u nukleus i aktivira transkripciju velikog broja ciljnih gena, među kojima se nalazi i COX-2, PLA₂, mPGES (Surh i sar., 2001; Chun i Surh, 2004; Santangelo i sar. 2007).

MAPK proteini pripadaju familiji Ser/Thr kinaza i obuhvataju četiri grupe, koje su aktivirane specifičnim kinazama MAP kinaza (MAPKK, *MAP kinase kinases*):

1. (ERK) 1/2 (*extracellular signal-related kinases*), aktivirana je MEK1/2
2. JNK 1/2/3 (*c-Jun amino-terminal kinase*), aktivirane delovanjem MKK4/7 (JNKK1/2)
3. p38-MAP kinaze (α, β, δ, i γ), aktivirane MKK3/6
4. ERK5 aktivirane delovanjem MEK 5

Aktivirane MAPK se premeštaju u nukleus i fosforiluju odgovarajuće transkripcione faktore. Osim mnogobrojnih članova MAPK familije, kompleksnost i raznovrsnost ovog signalnog puta dodatno je uslovljena činjenicom da svaka od MAPKK može biti aktivirana delovanjem više od jedne MAPKK kinaze (MAPKKK; Chun i Surh, 2004; Santangelo i sar. 2007).

Neki od transkripcionih faktora uključenih u LPS indukciju proinflammatoryh gena su AP-1 i C/EBP familija transkripcionih faktora. Šema signalnog puta indukcije ekspresije PLA₂, COX-2 i mPGES gena delovanjem LPS na monocite prikazana je na *Slici 4.5*.



Slika 4.5. Pretpostavljeni signalni put indukcije ekspresije *cPLA₂α*, *COX-2*, *mPGES-1* mRNA delovanjem LPS-a

(prilagođeno iz Kang i sar., 2004)

AP-1, proteinski faktor aktiviranja transkripcije; C/EPBs, CCAAt vezujući proteini; CRE, element regulisan cAMP (*cAMP-response element*); IRAK, kinaza povezana sa IL-1 receptorom; IKK, IκB kinaza kompleks; NF-κB, nuklearni faktor kapa B; IκB, inhibitorna podjedinica NF-κB; MAPK, mitogen-aktivirane protein kinaze: EPK1/2, JNK/SAPK, p38; MyD88, faktor mijeloidne diferencijacije 88; NEMO, regulatorna podjedinica IKKγ (*NFκB essential modifier*); IRF3 faktor regulacije interferona 3; NIK, NF-κB-indukovana kinaza; TLR4, receptor toll-like receptor 4; TRAF, TNF kinaza 6 povezana sa TNF receptorom;

LPS formira kompleks sa LPS vezujućim proteinom i monocitnim diferencijalnim antigenom (CD14) koji se vezuju za receptor TLR4 (*toll-like receptor 4*) izazivajući njegovu dimerizaciju. Humani TLR4 je transmembranski protein sa ekstracelularnim domenom koji je bogat leucinom i zadužen za prepoznavanje liganda, i citoplazmatskim domenom koji je homologan domenu IL-1 receptora i koji je neophodan za dimerizaciju. Nakon aktivacije, TLR4 intereaguje sa dva adaptivna molekula: faktorom mijeloidne diferencijacije 88 (MyD88) i TRIF (ili TICAM-1, *Toll/IL-1TR domain-containing adaptor inducing IFN-β*).

MyD88 dalje aktivira dve različite serin-treonin kinaze, a prva je kinaza povezana sa IL-1 receptorom (IRAK, *IL-1 receptor-associated kinase*). IRAK zatim stupa u interakciju sa adapterom - kinazom 6 povezanom sa TNF receptorom (TRAF6, *TNF receptor associated factor 6*), koja zatim aktivira TGFβ aktiviranu kinazu (TAK-1, *transforming growth factor β-activated kinase*). TAK pripada porodici MAPKKK i inicira JNK, ERK i p38 MAPK signalne kaskade. TRAF-6 može da intereaguje i sa drugom kinazom - NF-κB indukujućom kinazom (NIK, *NF-κB inducing kinase*). NIK aktivira kompleks IKK koji direktno fosforiliše IκB. Fosforilacija IκB inicira njegovu razgradnju posredovanu ubikvitin-proteazom, i oslobađa se i aktivira NF-κB protein koji migrira u jedro i indukuje transkripciju COX-2 i drugih proinflamatornih enzima. Ovaj put predstavlja ranu fazu indukcije enzima (Kang i sar., 2004; Vaure i Liu, 2014).

Drugi, MyD88 nezavisni put, uključuje TRIF i adaptivni molekul povezan sa TRIF-om (TRAM, *TRIF related adaptor molecule*). Oni dalje aktiviraju faktor regulacije interferona 3 (IRF3, *interferon regulatory factor-3*) i vode odloženoj aktivaciji NF-κB (kasna faza; Kang i sar., 2004; Vaure i Liu, 2014).

4.6. Inhibitori ciklooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline

4.6.1. Nesteroidni anti-inflamatorni lekovi (NSAIL) i sintetska jedinjenja kao inhibitori produkcije i delovanja PGE₂ i TXA₂

Dve najveće grupe anti-inflamatornih lekova obuhvataju selektivne i neselektivne inhibitore ciklooksigenaza. Neselektivni inhibitori obuhvataju glukokortikoide, klasu steroidnih jedinjenja, i nesteroidne anti-inflamatorne lekove (NSAIL ili NSAID, *non-steroidal anti-inflammatory drug*).

Glukokortikoidi imaju široku upotrebu u tretmanu imunih, inflamatornih i alergijskih reakcija. Nažalost, duža primena ovih lekova praćena je nizom neželjenih efekata kao što su osteoporoza, promene raspoloženja, kardiovaskularni i metabolički poremećaji. Glukokortikoidi se vezuju za odgovarajuće receptore, koji pripadju grupi nuklearnih receptora i koji se vezuju na GRE sekvence na promotornim regionima različitih gena i time supresuju ili indukuju njihovu transkripciju. Takođe, mogu da intereaguju sa MAPK kinazama i transkripcionim faktorima kao što su AP-1 i NF- κ B, i tako supresuju ekspresiju proinflamatornih enzima, uključujući i COX-2, mPGES-1 i PLA₂. Osim na nivou gena, glukokortikoidi inhibiraju i sintezu različitih proinflamatornih medijatora, uključujući i COX-2 protein, tako što stimulišu degradaciju njegove mRNK (Ronchetti i sar., 2018).

S obzirom da je osobađanje arahidonske kiseline prvi korak sinteze mnogobrojnih proinflamatornih medijatora, inhibicija PLA₂ predstavlja jednu od potencijalnih meta anti-inflamatornih lekova. Prednost inhibicije PLA₂ u odnosu na inhibiciju drugih enzima ciklooksigenaznog puta ogleda se u tome da ne dolazi do akumulacije ni jednog metabolita COX puta, koji često međusobno deluju kao agonisti ili antagonisti, ili povećane aktivnosti enzima nekih drugih metaboličkih puteva arahidonske kiseline. Takođe, inhibicijom PLA₂ inhibirana je i produkcija lizofosfolipida koji i sami često mogu da deluju kao inflamatorni medijatori. Do sada su najviše razvijani inhibitori PAF-PLA₂, cPLA₂ α , sPLA₂ i iPLA₂ β . Mnogi od ovih inhibitora su u drugoj ili trećoj fazi kliničkih ispitivanja, ali ni jedan nije dostupan na tržištu (Yedgar i sar., 2000; Kokotou i sar., 2017; Nikolaou i sar., 2019).

Ispitivani inhibitori PAF-PLA₂ predstavljaju derivate pirimidin-4-ona (darapladib), hinlona (rilapladib) i bicikličnih pirimidina i indolizina, a najčešće se ispituju kao potencijalni terapeutici hronične vaskularne inflamacije (ateroskleroza i koronarne bolesti srca), Alchajmerove bolesti i dijabetske retinopatije (Kokotou i sar., 2017a; Nikolaou i sar., 2019).

Najčešći inhibitori cPLA₂ α predstavljaju derivate indola (ecopladib, efipladib, giripladib, ZPL-5212372), pirolidina (pirofenon i RSC-3388), 2-oksotiazola (AVX235) i 2-oksoestara (GK452), a interesantna grupa su i derivati ω -3 masnih kiselina (AVX001). U kliničkim studijama se ispituje delotvornost inhibitora cPLA₂ u tretmanu atopijskog dermatitisa, psorijaze, reumatoidnog artiritisa i osteoartritisa (Kokotou i sar., 2017a; Kokotou i sar., 2017b; Nikolaou i sar., 2019).

Varespladib (indolni derivat) je najpoznatiji inhibitor sPLA₂. Ispitivan je kao potencijalni terapeutik akutnog koronarnog sindroma, ali rezultati kliničkih studija nisu potvrdili ovu primenu. Druga potencijalna upotreba je kao antidot zmijskog otrova (Nikolaou i sar., 2019).

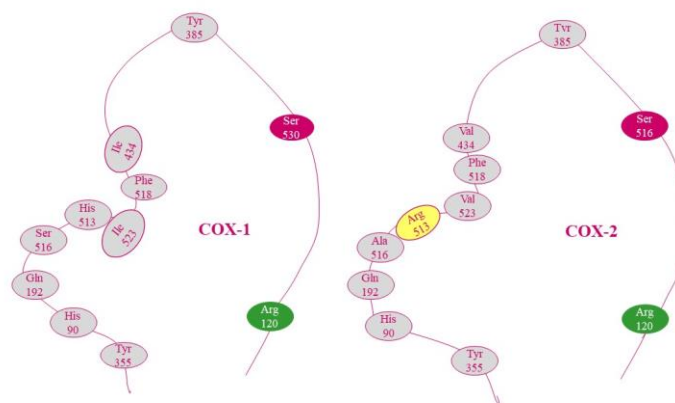
Polifluoroketoni (FKGK18) predstavljaju glavnu klasu inhibitora iPLA₂, a imaju potencijalnu primenu u terapiji dijabetesa i multiple skleroze. Bromenol-lakton je selektivni ireverzibilni inhibitor iPLA₂ zahvaljujući kom su otkrivene mnoge funkcije iPLA₂ (Nikolaou i sar., 2019).

U *in vivo*, *in vitro* i *in silico* studijama ispitvana je selektivnost različitih inhibitora ka cPLA, iPLA₂ i sPLA₂ i utvrđeno je da ista fluoroketonska funkcija može biti korišćena i za inhibiciju cPLA₂ α i iPLA₂ β , pri čemu je dužina hidrofobnog lanca ključna za aktivnost i selektivnost. Jedinjenja koja imaju duži bočni niz ispoljavaju veću selektivnost ka cPLA₂ α , a jedinjenja sa kraćim bočnim nizom ka iPLA₂ β (Nikolaou i sar., 2019).

Na tržištu je dostupan veliki broj NSAIL, a glavne grupe čine derivati propionske kiseline: ibuprofen i naproksen; derivati indolsirćetne i fenilsirćetne kiseline: indometacin, diklofenak, sulindak; derivati enolne kiseline: meloksikam i prikosikam i derivat antranilne kiseline: menfeminska kiselina (Perrone i sar., 2010).

Aspirin, derivat salicilne kiseline, ireverzibilno blokira obe izoforme ciklooksigenaze tako što acetiluje serinski ostatak u položaju 530 kod COX-1, odnosno Ser516 kod COX-2. Aspirin je jedini inhibitor koji se kovalentno vezuje u aktivnom centru, a 10–100 puta bolje inhibira COX-1 nego COX-2 (Perrone i sar., 2010). Međutim, inhibicija COX-2 ima dodatne pozitivne efekte. Usled acetilovanja, COX-2 u endotelnim ćelijama konvertuje arahidonsku kiselinu u 15*R*-HETE, koja se transcelularnom biosintezom, odnosno delovanjem 5-LOX u leukocitima, epitelinim ili endotelnim ćelijama konvertuje u 15-*epi*-lipoksin, koji ispoljava anti-inflamatorno delovanje (Stables i Gilroy, 2011).

Jedino aspirin obrazuje kovalentne veze u aktivnom centru, dok drugi NSAIL postižu inhibiciju COX-1 i COX-2 na sredini hidrofobnog kanala, formiranjem vodonične veze sa polarnim argininom u položaju 120 (*Slika 4.6.*). To znači da NSAIL mogu da inhibiraju obe izoforme enzima, pri čemu anti-inflamatorni i analgetski efekat potiče od inhibicije COX-2, a kontraindikacije od inhibicije COX-1. S obzirom da je COX-1 prvenstveno ekspresovana u gastričnoj mukozi, inhibicija ove izoforme često je praćena ostećenjem mukoze želuca i krvarenjem u želucu (Goldenberg, 1999).



Slika 4.6. Šema aktivnog centra COX-1 i COX-2 enzima - aminokiseline važne za vezivanje inhibitora
Ljubičasto-aspirin; zeleno-NSAIL; žuto-koksibi (prilagođeno iz Knights i sar., 2010)

Upravo su kontraindikacije uzrokovane inhibicijom COX-1 inicirale potrebu za razvojem selektivnih inhibitora COX-2, poznatih pod imenom koksibi (*coxibs*). Naime, 1991. godine, nakon otkrića COX-2, pretpostavljeno je da bi selektivni inhibitori COX-2 mogli da postanu novi pristup u tretmanu inflamacije, sa manje neželjenih efekata u odnosu na tada postojeće lekove. Potencijal nekog jedinjenja da selektivno inhibira samo COX-2, a ne i COX-1 (ili obrnuto), procenjuje se poređenjem inhibitorne aktivnosti, odnosno izračunava se kao odnos IC_{50} vrednosti pri kojima ispitivano jedinjenje inhibira COX-2 i COX-1 (Perrone i sar., 2010). Intenzivna naučna istraživanja u cilju pronalaska selektivnih inhibitora COX-2, koji bi ispoljili što manje neželjenih efekata, rezultovala su pojavom koksiba na tržištu samo osam godina nakon definisanja strukture i funkcije COX-2 (Rainsford, 2007).

Selektivni COX-2 inhibitori se vezuju u bočni džep hidrofobnog kanala COX-2 i interaguju sa Arg513 (Slika 4.6.). U molekulu COX-1 ne postoji sporedni hidrofobni džep (Slika 4.6.), čime je onemogućeno vezivanje selektivnih NSAIL u COX-1.

Strukturno, selektivni inhibitori COX-2 su diaril-heterocikli koji sadrže dva aromatična prstena sa sulfonamidnim ili metilsulfonil grupama, a vezani su za središnji heteroprsten (Perrone i sar., 2010). Selektivni COX-2 inhibitori mogu da blokiraju upalu i bol, a da je pri tom smanjena i pojava sporednih efekata u gastrointestinalnom traktu, povezanih sa inhibicijom COX-1 (Goldenberg, 1999; Marks i Fürstenberg, 1999). Međutim, i COX-2 selektivni inhibitori ispoljavaju neželjene efekte, prvenstveno u kardiovaskularnom sistemu, jer znatno povećavaju rizik od infarkta miokarda (Rainsford, 2007). Uzrok ovih neželjenih efekata je ranije pomenuta, konstantna ekspresiji COX-2 u određenim tkivima. COX-2, konstantno ekspresovana u endotelnim ćelijama, je prvenstveno odgovorna za produkciju PGI_2 , te se njenom inhibicijom narušava odnos koncentracija PGI_2 i TXA_2 u kardiovaskularnom sistemu. Naime, koksibi inhibiraju sintezu PGI_2 produkovanog od strane COX-2 i odgovornog za vazodilataciju i inhibiciju agregacije trombocita, a sa druge strane ne narušavaju sintezu TXA_2 produkovanog u trombocitima delovanjem COX-1, čime je ravnoteža pomerena ka vazokonstrikciji i agregaciji trombocita. Usled inhibicije COX-2 u bubrezima, smanjena je koncentracija

PGI₂ i PGE₂, što uzrokuje poremećaje u radu bubrega praćene hipertenzijom. Zbog ovih neželjenih efekata, najinvazivniji koksibi su povučeni sa tržišta, a među prvim su bili rofekoksib i valdekoksib. Usled navedenih nedostataka postojećih inhibitora, velika je potražnja za novim farmakološkim pristupima inhibiciji produkcije proinflammatoryh prostanoida. Međutim, koksibi svakako mogu da se koriste kao potencijalni antitumorski lekovi (Rainsford, 2007; Rouzer i Marnet, 2009; Koeberle i Werz, 2015; Koeberle i Werz, 2018).

Tokom godina, sa porastom saznanja o ulozi COX-1 u različitim patofiziološkim stanjima, i ovaj enzim je postao zanimljiv kao potencijalna meta farmakoterapeutskih agenasa. Najviše se ispituje potencijal selektivnih inhibitora COX-1 u tretmanu neuroinflamacije i kancera u kojima je povišena ekspresija COX-1, prvenstveno kancera jajnika. Takođe, zahvaljujući otkriću ovih inhibitora ispostavilo se da kontraindikacije u gastrointestinalnom traktu ne potiču nužno od inhibicije COX-1, već istovremene inhibicije obe izoforme COX-1/2, jer se ulcerogeni efekti ne ispoljavaju ukoliko se odvojeno primene selektivni inhibitori COX-1 ili selektivni inhibitori COX-2. Najpoznatiji selektivni inhibitori COX-1 su SC-560, mofezolak i FR122047. Mofezolak je jedino odobren u Japanu za kliničku upotrebu kao analgetik, dok SC-560 i FR122047 nisu prošli klinička ispitivanja, ali imaju široku primenu u *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima o funkciji COX-1 (Perrone i sar., 2010; Vitale i sar., 2016; Pannunzio i Coluccia, 2018).

Jedan od od aktuelnih pravaca istraživanja je i inhibicija mPGES-1, koja obećava selektivno smanjenje proinflammatoryh PGE₂, bez uticaja na proizvodnju homeostatskog PGE₂ i drugih prostanoida. Stoga se, tokom poslednjih godina, ulažu veliki naponi da se razviju selektivni inhibitori mPGES-1 kao potencijalni kandidati za lek (Koeberle i Werz, 2018).

In vivo ispitivanja pokazuju da se selektivnom blokadom ekspresije ili aktivnosti mPGES-1 postiže uporediva anti-inflamatorna i antitumorska efikasnost kao pri inhibiciji COX-2, ali sa znatno manje neželjenih efekata u gastrointestinalnom i kardiovaskularnom sistemu. Međutim, kada je reč o analgetskom delovanju, COX inhibitori su efikasniji, jer PGE₂ nije jedini prostanooid koji doprinosi osećaju bola. Prvi selektivni inhibitor mPGES je otkriven 2005. godine, ali na tržištu još uvek ne postoji lek zasnovan na ovom principu delovanja. Nekoliko jedinjenja koja deluju kao selektivni inhibitori mPGES-1 stigli su do kliničkih ispitivanja. GRC 27864 je trenutno u drugoj fazi kliničkih ispitivanja, dok su klinička ispitivanja LY3023703 zaustavljena u prvoj fazi, jer izaziva oštećenja jetre (Sant i sar., 2018). Inhibitor mPGES-1 koji je najbliži komercijalnoj upotrebi je likofelon, koji inhibira i 5-lipooksigenaza aktivirajući protein (FLAP, *5-lipoxygenase-activating protein*) i COX-1, a trenutno je u trećoj fazi kliničkih ispitivanja kao potencijalni lek za osteoartritis. Smatra se da su dobri inhibitori mPGES-1 amfifilni molekuli koji sadrže lipofilan rep i polarnu glavu, koja je negativno naelektrisana i/ili može da gradi vodonične veze. Najveće prepreke u razvoju ovih lekova su slaba rastvorljivost i neefikasnost lipofilnih inhibitora u plazmi usled vezivanja za proteine plazme, slaba selektivnost ka različitim PGES, multifunkcionalnost PGE₂ i postojanje razlike između humanog mPGES-1 i mPGES-1 najčešće korišćenih eksperimentalnih životinja (miševa i pacova). Osim razvoja mPGES-1 selektivnih inhibitora, velika pažnja se posvećuje razvoju dualnih inhibitora mPGES-1 i 5-LOX,

čime se supresuju dva glavna proinflamatorna puta metabolizma arahidonske kiseline. Veliki broj prirodnih jedinjenja deluju upravo kao dualni inhibitori mPGES-1 i 5-LOX (Hara i sar., 2010; Koeberle i Werz, 2015; Koeberle i sar., 2016; Koeberle i Werz, 2018; Bergqvist i sar., 2020).

Primena agensa koji bi inhibirali produkciju i aktivnost TXA₂ takođe predstavlja jedan od fundamentalnih terapijskih pristupa lečenju kardiovaskularnih bolesti i kancera. Razlikuju se agensi koji deluju kao inhibitori TXAS, kao antagonisti receptora ili na oba načina (dualni inhibitori). Za razliku od inhibitora ciklooksigenaza, inhibicija TXAS vodi povećanju koncentracije PGH₂ i povećanoj sintezi drugih prostanoida, uključujući i PGI₂. S obzirom da PGI₂ ispoljava antikoagulantno delovanje, pretpostavljalo se da bi ovi inhibitori bili bolji antikoagulansi od aspirina. Međutim, ove studije nisu dale očekivane kliničke rezultate, najverovatnije zbog akumulacije prekursora, PGH₂ koji deluje kao agonist TP receptora. Jedinjenja koja deluju kao dobri inhibitori TXAS imaju karboksilnu grupu na jednom kraju i 1-imidazoili ili 3-piridil grupu na drugom kraju. Danas je na tržištu dostupno nekoliko inhibitora TXAS, a najpoznatiji su ozagrel (sadrži imidazoil grupu) i furegrelat (sadrži piridil grupu). Ozagrel je kompetitivni inhibitor koji je odobren 1992. u Japanu za lečenje bronhijalne astme. Danas se koristi za lečenje akutnog cerebralnog infarkta i poboljšanje nervnih funkcija, iako se kod 5% pacijenata javljaju teška krvarenja. Zbog toga se intenzivno traga za novim inhibitorima, a jedan od potencijalnih lekova koji je uspešno završio prvu fazu kliničkih ispitivanja je piragrel (Dogné i sar., 2006; Nakahata, 2008; Kontogiorgis i Hadjipavlou-Litina, 2010; Zou i sar., 2019).

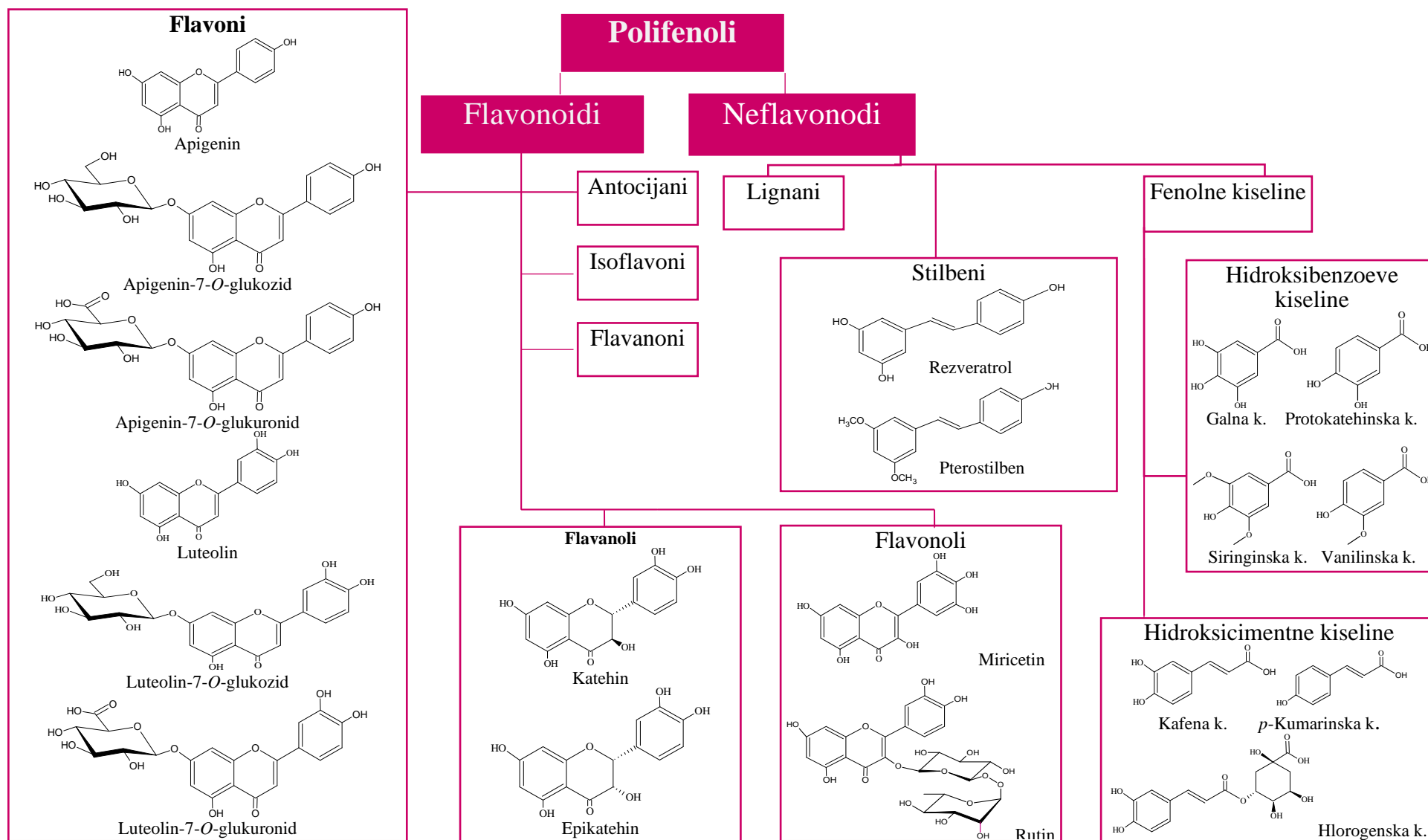
Za razliku od inhibitora TXAS, agonisti receptora ne sprečavaju samo delovanje TXA₂ već i drugih strukturno sličnih metabolita kao što su PGH₂ i izoprostani koji deluju preko istih receptora. Poznato je nekoliko agonista: ifetroban, sulotroban, daltroban, linotroban, ramatoroban, seratroban i terutroban (Dogné i sar., 2006; Kontogiorgis i Hadjipavlou-Litina, 2010).

Dualni inhibitori dejstva TXA₂ (deluju i na enzim i na receptore za koje se vezuje TXA₂) objedinjuju prednosti oba prethodno navedena tipa, a najpoznatiji su ridogrel i pikotamid. Sintaza ovih dualnih inhibitora usmerena je ka pronalaženju derivata koji pri istoj koncentraciji ispoljavaju približnu sposobnost inhibicije na oba načina. Rezultati novijih istraživanja pokazuju da dualni inhibitori dejstva TXA₂ sprečavaju angiogenezu u humanim endotelnim ćelijama, sugerišući da ovaj put može biti atraktivna meta za anti-kancer terapiju. Nova klasa inhibitora koji se trenutno razvijaju su agensi sa dualnim dejstvom koksiba i agonista receptora za TXA₂, koji bi sprečili štetne efekte nedostatka PGI₂ uzrokovane selektivnom inhibicijom COX-2 (Marks i Furstenberger, 1999; Dogné i sar., 2006; Nakahata, 2008; Cathcart, 2010; Kontogiorgis i Hadjipavlou-Litina, 2010; Born, 2012; Zou i sar., 2019).

4.6.2. Polifenolna jedinjenja kao modulatori ekspresije i aktivnosti enzima uključenih u produkciju PGE₂ i TXA₂

Usled kontraindikacija pri upotrebi sintetičkih inhibitora, velika pažnja je usmerena ka pronalasku inhibitora enzima ciklooksigenaznog puta među prirodnim proizvodima. Tradicionalne medicine različitih zemalja svedoče o blagotvornom dejstvu biljaka na organizam, između ostalih i protivupalnom delovanju. Stoga su širom sveta inicirana ispitivanja tačnih mehanizama delovanja i izolovanja komponenti odgovornih za biološke aktivnosti biljaka. Prednost ovih komponenti je ta što su one svakako zastupljene u humanoj ishrani, te se za veliki broj zna da ne ispoljavaju toksične efekte, ili ispoljavaju znatno slabije, u odnosu na sintetičke lekove. Među jedinjenjima odgovornim za blagotvorna dejstva biljaka često se izdvajaju polifenoli, sekundarni metaboliti biljaka. U naučnoj literaturi pojavljuju se dva termina, fenoli, kao naziv jedinjenja koji sadrže bar jedan aromatičan prsten i jednu ili više hidroksilnih grupa, i polifenoli, kao naziv jedinjenja koja sadrže više aromatičnih prstenova u svojoj strukturi. Danas se pod terminom polifenolna jedinjenja obuhvataju obe navedene grupe, i u okviru ove disertacije će se termin polifenolna jedinjenja upotrebljavati za obe grupe.

Sekundarni metaboliti su neophodni kako bi se biljka prilagodila na uslove sredine u kojoj živi (odbrana od patogena, herbivora, oksidativnog stresa, UV zračenja). U zavisnosti od broja i načina na koji su povezani fenolni prstenovi, razlikuje se nekoliko grupa polifenolnih jedinjenja: fenolne kiseline (derivati hidroksicimentne i hidroksibenzojeve kiseline), stilbeni, kumarini, lignani i flavonoidi (antocijanidini, isoflavoni, flavoni, flavanoni, flavanonoli, flavonoli i flavanoli, *Slika 4.7.*). U biljkama su flavonoidi najčešće konjugovani sa šećerima (glikozidi) ili se nalaze u formi polimera. Ova klasa jedinjenja ispoljava niz bioloških aktivnosti: antioksidantnu, antimikrobnu, antiviralnu, imunomodulatornu, anti-inflamatornu. Polifenolna jedinjenja mogu da deluju kao signalni molekuli, odnosno kao regulatori signalnih puteva, ili kao inhibitori enzima (Sobhani i sar., 2020).



Slika 4.7. Klasifikacija polifenolnih jedinjenja i strukture jedinjenja korišćenih u okviru ovog istraživanja

Složena kaskada regulacije ekspresije COX-2, ali i drugih proinflammatoryh enzima, obuhvata niz medijatora koji deluju od transkripcionog do posttranslacionog nivoa, što pruža mogućnost modulacije ekspresije ovih enzima, a time i produkcije PGE₂ i TXA₂, delovanjem na više nivoa. Mnogi prirodni proizvodi, uključujući i polifenolna jedinjenja, dokazano supresuju ekspresiju gena proinflammatoryh enzima. Za neke od njih je utvrđen i tačan mehanizam delovanja. Jedno jedinjenje može da deluje na divergentne transkripcione faktore i ispoljava različite aktivnosti u zavisnosti od ćelije na koju deluje. Polifenolna jedinjenja prvenstveno deluju kao modulatori nekog od narednih signalnih puteva:

1. Nf- κ B kaskade: rezveratrol (Takada i sar., 2004); epigalokatehin galat, apigenin (He i sar., 2019), luteolin (Chen i sar., 2007); genistein, kemferol (García-Mediavilla i sar., 2007; Yoon i sar., 2013); krisin (He i sar., 2019), epikatehin, katehin, kvercetin (García-Mediavilla i sar., 2007; Liu i sar., 2012); morin (Sivaramakrishnan i Devaraj, 2009); delfinidin (Haseeb i sar., 2013.); hlorogenska kiselina (Xu i sar., 2010; Cerella i sar., 2010; Mitjavila i Moreno, 2012),

2. AP-1 zavisne kaskade: kurkumin, luteolin (Chen i sar., 2007.); rezveratrol, epigalokatehin galat, kvercetin, hesperidin (Mitjavila i Moreno, 2012);

3. MAP kinaza-zavisne kaskade (JNK, p38 ili ERK): rezveratrol, epigalokatehin galat (Kundu i sar., 2003); kemferol (Yoon i sar., 2013); elagna kiselina (Rosillo i sar., 2011); krisin, apigenin, luteolin, kvercetin, katehin, delfinidin, cijanidin, cijanidin-3-*O*-glukozid (Cerella i sar., 2010; Santangelo i sar., 2007).

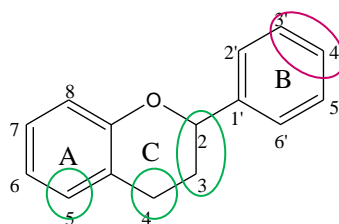
Neka jedinjenja, kao što su magniferin i epigalokatehin galat, osim na transkripcionom nivou, mogu da deluju i tako što destabilizuju mRNK COX-2 (Cerella i sar., 2010).

4.6.2.1. Polifenolna jedinjenja kao modulatori ekspresije i aktivnosti PLA₂

Prvi rad u kom je ispitan uticaj polifenolnih jedinjenja na aktivnost fosfolipaze datira još iz 1982. godine, kada je pokazano da kvercetin može da inhibira oslobađanje arahidonske kiseline iz fosfolipidnog dvosloja neutrofila (Lee i sar., 1982). Od tada je ispitan veliki broj polifenolnih jedinjenja kao potencijalnih inhibitora PLA₂. Polifenoli koji su pokazali sposobnost inhibicije sPLA₂ GII su apigenin, miricetin, hesperetin, rutin, kvercitrin (Lindahl i Tagesson, 1997), kvercetin, kemferol, galangin (Lättig i sar., 2007). Dileep i saradnici su ustanovili da derivati benzojeve kiseline - galna, protokatehinska, vanilinska i siringinska kiselina inhibiraju sPLA₂ korišćenjem pankreasne PLA₂ kao model sistema (Dileep i sar., 2015). PLA₂ GII, poreklom iz zmijskog otrova, često je korišćena za ispitivanje potencijalnih inhibitora ovog enzima. Na ovom model sistemu dokazano je da rozmarinska kiselina (Ticli i sar., 2005), elagna kiselina (Da Silva i sar., 2008), epikatehingalat, propil galat, galna, kafena i ferulna kiselina (Pereñez i sar., 2011), kvercetin, 3-*O*-metilkvercetin, ramnetin i ramnazin (Novo Belchor i sar., 2017) deluju kao inhibitori PLA₂. Flavonoidi vognin, bajkalin i bajkalein (Ku i sar., 2015), vicenin-2 i skolimozid (Lee i Bae, 2015) inhibiraju aktivnost, ali i ekspresiju gena sPLA₂ GII u *in vitro* i *in vivo* uslovima. Elagna kiselina i kvercetin snižavaju ekspresiju sPLA₂ GIIA u *in vitro* modelu intestinalne inflamacije, dok rezveratrol, genistein, ferulna

kiselina, (-)-epigalokatehin-3-galat i kurkumin snižavaju i ekspresiju COX-1 (Sergent i sar., 2010).

Tokom niza godina ispitan je veliki broj prirodnih proizvoda kao potencijalnih inhibitora ovog enzima i pretpostavljeno je koje su strukturne karakteristike neophodne za selektivnost inhibicije različitih grupa i izoformi sPLA₂. Kako bi ispoljili sposobnost inhibicije sPLA₂ neophodno je da flavonoidi (Slika 4.8.) sadrže dvostruku vezu između atoma C-2 i C-3 C prstena, keto funkciju u položaju 4 i hidroksilne grupe u položaju 5 i 7 u A prstenu. Takođe, pretpostavlja se da i hidroksilna grupa u položaju 3 u A prstenu doprinosi inhibitornoj sposobnosti. Flavonoidi koji poseduju hidroksilnu grupu u poziciji 3' i 4' u B prstenu, ispoljavaju selektivnost prema inhibiciji sPLA₂ II u odnosu na PLA₂ I. Flavonoidi sa malim modifikacijama B prstena, kao što su apigenin (nema hidroksilnu grupu u položaju 3') ili miricetin (ima dodatnu hidroksilnu grupu u položaju 5') zadržavaju visoku sposobnost inhibicije PLA₂ II, ali ne ispoljavaju selektivnost (Lindahl i Tagesson, 1997; Lättig i sar., 2007). Derivati kvercetina sa metilovanom hidroksilnom grupom u položaju C-7 ispoljavaju bolju aktivnost od derivata kod kojih su metilovane funkcije i u položaju C-3 i C-4' (Novo Belchor i sar., 2017).



Slika 4.8. Osnovna struktura flavonoida: strukturne karakteristike važne za inhibiciju PLA₂

zeleno - strukturni delovi važni za inhibiciju sPLA₂, ljubičasto - važno za selektivnu inhibiciju PLA₂ GII

Smatra se da polifenolna jedinjenja vrše inhibiciju tako što formiraju vodonične veze sa His48 i Asp49 u katalitičkom centru (Pereañez i sar., 2011) ili/i sa aminokiselinama neophodnim za vezivanje Ca²⁺: Tyr28, Gly30, Gly32 i Asp49 (Alam i sar., 2016; Delmondes i Stefani, 2018) i Cys44 i Lys62 (Lättig i sar., 2007), uz prisustvo Van der Valsovih i hidrofobnih interakcija.

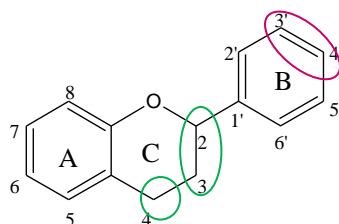
Pretpostavlja se da hlorogenska kiselina deluje prvenstveno kao antagonist sPLA₂ i sprečava njegovo vezivanje za receptore, a ne kao inhibitor aktivnosti samog enzima (Toyama i sar., 2014). Međutim, i neka druge klase prirodnih proizvoda inhibiraju navedeni enzim: ursolna kiselina (Nataraj i sar., 2007), piperin i aristolohinska kiselina (Yarla i sar., 2016).

U pogledu cPLA₂, dokazano je da nju inhibiraju kvercetin, apigenin pri visokim koncentracijama, biflavonoidi amentflavon i ginkgetin, pri čemu biflavonoidi imaju bolju aktivnost (Kim i sar., 2001). Kvercetin i honokiol deluju tako što inhibiraju fosforilaciju i time sprečavaju aktiviranje cPLA₂ (Chuang i sar., 2016).

4.6.2.2. Polifenolna jedinjenja kao modulatori ekspresije i aktivnosti COX-1/2

Jedan od osnovnih mehanizama kojim se supresuje inflamacija je inhibicija ciklooksigenaza. Najveći broj komercijalno dostupnih anti-inflamatornih lekova deluje upravo na ovaj način.

Inhibicija ciklooksigenaza je mehanizam koji čini osnovu anti-inflamatornog delovanja mnogih polifenola (*Tabela 4.4.*). Dokazano je da razlike u strukturi flavonoida uslovljavaju različitu sposobnost inhibicije izoformi ciklooksigenaze. Naime, dvostruka veza između atoma C-2 i C-3 molekula flavonoida, koja uslovljava planarnost molekula, esencijalna je za dobru inhibitornu aktivnost COX-1 izoforme (*Slika 4.9.*; Wang i sar., 2000). Prisustvo katehol grupe na B prstenu neophodno je za dobru inhibiciju COX-2 (Ribeiro i sar., 2014). Rezultati studije molekulskog modelovanja („doking“ studije) pokazuju da je katehol grupa B prstena luteolina orijentisana ka hidrofobnom džepu i formira vodonične veze sa Tyr385 i Ser530. Proučena je interakcija između krisina i apigenina sa COX-2, pri čemu je zaključeno da 5'-OH formira vodoničnu vezu sa Tyr355, dok 4'-OH na B prstenu apigenina formira dodatnu vodoničnu vezu sa Tyr385. Međutim, Ser530 je ostao slobodan, što naglašava značaj katehol grupe pri inhibiciji molekula COX-2 (De Mello i sar., 2011). Tezu o značaju katehol grupe potvrđuju i rezultati Seeram-a i saradnika (2003) da među antocijanima cijanidin poseduje najboji potencijal inhibicije COX-1/2. Nasuprot tome, Takano-Ishikawa i sar. (2006) smatraju da hidroksilacija B prstena smanjuje aktivnost, dok je prisustvo keto funkcije u položaju 4 u C prstenu neophodno za inhibiciju COX-2, a da dvostruka veza između C-2 i C-3, kao i prisustvo hidroksilnih grupa na C-5 i C-7 poboljšavaju datu aktivnost. Manje supstituisani flavonoidi su potentniji inhibitori COX-1, najverovatnije zbog voluminoznosti supstituisanih flavonoida koji ne mogu da se vežu u aktivnom centru COX-1 (Ribero i sar., 2014). Nasuprot tome, galoil derivati katehina i epikatehina ispoljavaju bolju aktivnost inhibicije COX-1 i COX-2 u odnosu na odgovarajuće katehine i epikatehine (Seeram i sar., 2003). Uočeno je da aglikoni ispoljavaju bolju aktivnost od odgovarajućih glikozida, a jedan od potencijalnih razloga može da bude i smanjena permeabilnost glikozida kroz ćelijske membrane (Takano-Ishikawa i sar., 2006). Kvercetin 3-*O*-galaktozid i kvercetin-3-*O*-glukuronid su bolji inhibitori COX-2 nego COX-1 (Mandour i sar., 2016). Sa druge strane, O'Leary i saradnici (2004) su uočili da kvercetin i kvercetin-*O*-sulfat ispoljavaju bolju inhibiciju u odnosu na kvercetin-3-*O*-glukuronid i izoramnetin-3-*O*-glukuronid. Nije uočena pravilnost kako metilovanje hidroksilnih grupa utiče na aktivnost, pa tako na primer tamoksiretin ispoljava bolju aktivnost od kvercetina, a izoramnetin lošiju (Lesjak i sar., 2018), 5,7-dimetoksi krisin je bolji inhibitor ciklooksigenaze od krisina (During i Larondelle, 2013), a malvidin i peonidin od delfinidina (Seeram i sar., 2003). During i Larondelle (2013) su pretpostavili da metilovanje hidroksilnih grupa u položaju 5 i 7 A prstena i položaju 3 C prstena poboljšava anti-inflamatornu aktivnost, dok metilovanje 3' hidroksilne grupe B prstena ima suprotan efekat.



Slika 4.9. Osnovna struktura flavonoida: strukturne karakteristike važne za inhibiciju COX

zeleno - dvostuka veza na ovom delu doprinosi inhibiciji COX-1; ljubičasto - katehol grupa na ovom delu doprinosi inhibiciji COX-2

Osim flavonoida, i druge klase polifenolnih jedinjenja predstavljaju dobre inhibitore COX-1/2, te su utvrđeni i mehanizmi vezivanja. Pretpostavlja se da cimetna kiselina formira vodonične veze između karboksilne grupe i Tyr385 i Ser530, i *p*-hidroksibenzoeva kiselina osim sa ove dve aminokiseline (Tyr385 i Ser530) formira i dodatnu vodoničnu vezu sa peptidom vezom između Val523 i Glu524, *p*-kumarinska kiselina intereaguje sa Tyr385 i Tyr355 (Finimundy i sar., 2017), dok ferulna kiselina formira vodonične veze sa Gln372 i Lys532 (Kumar i Pruthi, 2015). Najpoznatiji predstavnik stilbena, rezveratrol, je dobar inhibitor i COX-1 i COX-2 enzima. Metilovani analozi rezveratrola predstavljaju znatno slabije inhibitore, dok se hidroksilacijom poboljšava aktivnost, pri čemu neki hidroksilovani analozi, kao što je piceatanol ispoljavaju selektivnost ka inhibiciji COX-2. Rezultati „docking“ studije pokazuju da hidroksilovani analozi rezveratrola formiraju vodonične veze sa Arg120, Tyr385 i Ser530 (Murias i sar., 2004)

Inhibicija ciklooksigenaze, kao ključnog enzima ciklooksigenaznog puta je najviše ispitana. Međutim, većina objavljenih studija je rađena na ćelijskim kulturama, tj. u *in vitro* uslovima. Postoji manja količina rezultata dobijenih ispitivanjima na eksperimentalnim životinjama i oskudni podaci iz studija koje su uključile ispitivanje dejstva ovih jedinjenja na ljudima. Najveći nedostatak *in vitro* metoda je ispitivanje pojedinačnih polifenolnih jedinjenja, prvenstveno flavonoida, kao aglikona, iako se ova jedinjenja u biljkama nalaze uglavnom u formi glikozida. Ishranom se unosi veliki broj polifenolnih jedinjenja istovremeno, te se moraju uzeti u obzir potencijalni sinergistički ili antagonistički efekti. Takođe, koncentracije korišćene u ovim studijama su često mnogo više od fiziološki dostižnih koncentracija polifenolnih jedinjenja u zdravom subjektu. Osim toga, katabolizam polifenola u humanom organizmu je veoma složen. Polifenolna jedinjenja podležu mnogobrojnim metaboličkim reakcijama, prvenstveno reakcijama glukuronizacije, sulfatacije i metilovanja, a ovi metaboliti imaju različita biološka svojstva u odnosu na jedinjenja od kojih nastaju (Lotito i sar., 2011; Zhang i sar., 2019). Sve navedeno ograničava značaj *in vitro* ispitivanja nemetabolisanih polifenola. Međutim, značaj ovih ispitivanja ogleda se u tome da se se relativno brzo i bez velikih materijalnih troškova dobiju podaci o aktivnosti velikog broja jedinjenja, te se može napraviti izbor jedinjenja koji će ući u sledeću fazu ispitivanja.

U Tabeli 4.4. prikazna su neka od jedinjenja za koja je dokazana sposobnost inhibicije ekspresije ili aktivnosti COX-1/2, a time i produkcije PGE₂ i TXA₂.

Tabela 4.4. Polifenolna jedinjenja kao modulatori ekspresije i aktivnosti COX-1/2

Jedinjenje	Dejstvo	Model sistem / ćelijska linija	Opseg ispitvanih koncentracija	Referenca
Flavonoidi (Flavoni)				
Apigenin	Inhibira ekspresiju COX-2 i iNOS, praćeno smanjenjem produkcije NO i PGE ₂	Ćelijska linija mišjih makrofaga (J7741.A)	0.50/5.00/50.0 μmol/L	Raso i sar., 2001
	Inhibira sintezu COX-2	SNF1 miševi	20.0 mg/kg (dnevno tokom 8 nedelja)	Kang i sar., 2009a
	Inhibira aktivnost COX-2, bez uticaja na aktivnost COX-1	Humana krv	25.0-100 μmol/L	Ribeiro i sar., 2014
	Snižava nivo mPGES, COX-2, iNOS	C57BL/6 miševi kod kojih je indukovana kolitis	125 mg/kg dnevno	Márquez-Flores i sar., 2016
Luteolin	Snižava ekspresiju COX-2 i iNOS, produkciju PGE ₂ i NO, TNF α i IL-6 inhibirajući Ap-1 i NF- κ B aktivaciju u makrofagama	Ćelijska linija mišjih makrofaga (MH-S i RAW 264.7)	5.00/10.0/25.0 μmol/L	Chen i sar., 2007
	Skoro 2 puta efikasnije inhibira aktivnost COX-2 nego COX-1	Humana krv	25.0 - 100 μmol/L	Ribeiro i sar., 2014
Krisin	Inhibira produkciju PGE ₂ koji nastaje delovanjem COX-2	Ćelijska linija humanog kancera kolona (Caco2)	50.0 μmol/L	During i Larondelle, 2013
	5,7-diacetil krisin inhibira COX-2	Izolovani enzimi COX-1 i COX-2	0 - 100 μmol/L	Cho i sar., 2004
	Snižava ekspresiju gena i nivo COX-2 proteina	Ćelijska linija mišjih makrofaga (RAW264.7)	1.00 – 2.50 μmol/L	Woo i sar., 2004
Nobiletin	Inhibira produkciju PGE ₂ i ekspresiju COX-2	Ćelijska linija humanih sinovijalnih fibroblasta i ćelijska linija mišjih makrofaga (J7741.A)	4.00 - 64.0 μmol/L	Lin i sar., 2003.
	Supresuje ekspresiju COX-2 i inhibira cPLA ₂ α	Humani epidermalni keratinociti	16.0/32.0/64.0 μmol/L	Tanaka i sar., 2004.
Vogonin	Inhibira ekspresiju i aktivnost COX-2	Ćelijska linija mišjih makrofaga (RAW264.7)	0.10-100 μmol/L 0.10-50.0 μmol/L	Sook Chi i sar., 2001; Wakabayashi i Yasui, 2000
	Supresuje produkciju NO i PGE ₂ i ekspresiju gena iNOS i COX-2	Ćelijska linija mišjih makrofaga (RAW264.7)	20.0 - 40.0 μmol/L	Chen i sar., 2001.
Flavonoidi (Flavonoli)				
Kvercetin	Inhibira ekspresiju COX-2 i iNOS, praćeno smanjenjem produkcije NO i PGE ₂	Ćelijska linija mišjih makrofaga (J7741.A)	0.50/5.00/-50.0 μmol/L	Raso i sar., 2001
	Inhibira produkciju PGE ₂ i NO, kao i sintezu iNOS i u manjoj meri COX-2, ne utiče na ekspresiju mRNK ovih enzima	Ćelijska linija humanog adenokarcinoma pluća A549	1.00/10.0/25.0/50.0 μmol/L	Banerjee i sar., 2002
	Inhibira ekspresiju i aktivnost COX-2	Izolovani COX-2 enzim Ćelijska linija humanog kancera kolona (Caco2)	0.10/1.00/10.0 μmol/L	O'Leary i sar., 2004
	Snižava nivo COX-2 i iNOS inhibirajući aktivaciju NF- κ B	Ćelijska linija Chang ćelija jetre	5.00 - 200 μmol/L	García-Mediavilla i sar., 2007
	Inhibira ekspresiju COX -2	Ćelijske linije	25.0 - 300 μmol/L	Xiao i sar., 2011

	inhibirajući p300 (NF- κ B) i snižava nivo PGE ₂	adenokarcinoma dojke (MDA-MB-231 i MCF-7)		
Kemferol	Snižava nivo COX-2, iNOS i inhibirajući aktivaciju NF- κ B	Ćelijska linija Chang ćelija jetre	5.00 - 200 μ mol/L	García-Mediavilla i sar., 2007
	Inhibira aktivnost iNOS i COX-2	Karanganom indukovana inflamacija	50.0 mg/kg, 100 mg/kg	Mahat i sar., 2010
	Inhibira ekspresiju mPGES, ekspresiju COX-2, produkciju PGE ₂	Ćelijska linija mišjih makrofaga (J7741.A)	100 μ mol/L	Hämäläinen i sar., 2011
Izoramnetin	Inhibira ekspresiju mPGES, ekspresiju COX-2, produkciju PGE ₂	Ćelijska linija mišjih makrofaga (J7741.A)	100 μ mol/L	Hämäläinen i sar., 2011
Morin	Snižava ekspresiju NF- κ B i COX-2	Ćelije karcinoma jetre Vistar albino pacova	500 mg/kg	Sivaramakrishnan i Devaraj, 2009
Galangin	Inhibira ekspresiju COX-2 i iNOS, praćeno smanjenjem produkcije NO i PGE ₂ ,	Ćelijska linija mišjih makrofaga (J7741.A)	0.50/5.00/50.0 μ mol/L	Raso i sar., 2001
Flavonoidi (Flavanoni)				
Naringenin	Inhibira ekspresiju COX-2 i iNOS, praćeno smanjenjem produkcije NO i PGE ₂	Ćelijska linija mišjih makrofaga (J7741.A)	0.50/5.00/50.0 μ mol/L	Raso i sar., 2001
	Inhibira ekspresiju iNOS i COX-2	Ćelijska linija mišjih makrofaga (RAW264.7) i ćelijska linija mikroglia ćelija (BV2)	30.0 - 200 μ mol/L	Chao i sar., 2010
Hesperetin	Inhibira ekspresiju COX-2 mRNA	Ćelijska linija mišjih makrofaga (RAW264.7)	250 - 500 μ mol/L	Hirata i sar., 2005
Flavan-3-oli				
Epigalokatehin galat	Snižava nivo COX-2 u TPA stimulisanim ćelijama, supresuje ERK /p38 MAPK signalnu kaskadu	MCF-10A; Ženke ICR miševa	5.00-100 μ mol/L 20.0 -50.0 mg/kg	Kundu i sar., 2003
Flavonoidi (Antocijani)				
Delfinidin	Inhibira ekspresiju COX-2 supresijom MAPK kaskade	Ćelijska linija mišjih makrofaga (RAW264.7)	0 - 100 μ mol/L	Hou i sar., 2005
	Inhibira ekspresiju COX-2 i produkciju PGE ₂ inhibirajući aktivaciju NF- κ B	Humani hondrociti	10.0 μ g/mL	Haseeb i sar., 2013
Cijanidin	Inhibira COX-2 ekspresiju	Ćelijska linija mišjih makrofaga (RAW264.7)	75.0 μ mol/L	Hou i sar., 2005
Stilbeni				
Rezveratrol	Inhibira aktivaciju NF- κ B i inhibira aktivnost COX-1 i COX-2	Ćelijska linija humanih leukemijskih monocita (KBM-5)	10.0 – 50.0 μ mol/L	Takada i sar., 2004
	Snižava nivo COX-2, iNOS i TNF- α	C57BL/6 miševi kod kojih je indukovana kolitis i rak debelog creva	0 - 300 mg/kg	Cui i sar., 2010
	Snižava ekspresiju COX-2 i nivo PGE ₂	Sprague -Dawley pacovi kod kojih je indukovana artritis	10.0/50.0 mg/kg	Chen i sar., 2014
Fenolne kiseline				
Kafena kiselina	Inhibira UV-indukovanu ekspresiju COX-2 inhibirajući kinazu Fyn	Ćelijska linija mišjih epidermalnih ćelija (JB6 P+) Ženke ICR miševa	10.0-100 μ mol/L 0.20 /1.00 mmol/L	Kang i sar., 2009b

Hlorogenska kiselina	Inhibira UV-indukovanu ekspresiju COX-2 inhibirajući kinazu Fyn	Ćelijska linija mišjih epidermalnih ćelija (JB6 P+)	10.0-100 µmol/L	Kang i sar., 2009b
Elagna kiselina	Inhibira ekspresiju COX-2, mPGES-1 i cPLA2 α , ne utiče na ekspresiju COX-1	Monociti izolovani iz krvi	10.0/20.0/30.0 µmol/L	Karlson i sar., 2009
	Inhibira ekspresiju COX-1 i iNOS, i fosforilaciju MAPK kinaza	Vistar pacovi kod kojih je indukovan kolitis	10.0 – 20.0 mg/kg	Rosillo i sar., 2011

4.6.2.3. Polifenolna jedinjenja kao modulatori ekspresije i aktivnosti mPGES-1

Mnogobrojna polifenolna jedinjenja inhibiraju produkciju PGE₂ (Tabela 4.4.), ali samo za nekoliko je potvrđeno da deluju na nivou mPGES-1.

Kurkumin (Koeberle i sar., 2009b), epigalokatehin galat (Koeberle i sar., 2009a), kanflavin A i B (Werz i sar., 2014) i lignani izolovani iz korena biljke *Kramaria lappacea* (Baumgartner i sar., 2011) inhibiraju mPGES-1 u mikromolarnim koncentracijama, mnogo nižim od onih koje su potrebne za inhibiciju ekspresije COX-2. U radu Hämäläinen i saradnika (2011) pokazano je da kemferol i izoramnetin inhibiraju LPS indukovanu ekspresiju mPGES preko 50%, dok flavon, luteolin-7-*O*-glukozid, morin, pelargonidin i genistin ispoljavaju slabiju inhibiciju (20-30%). Luteolin (Wang i sar., 2007), rezveratrol (Candelario-Jalil i sar., 2007), elagna kiselina (Karlsson i sar., 2010) i elagatanini (granatin A, granatin B i geranin) iz lista nara (*Punica granatum* L.; Toda i sar., 2020) snižavaju ekspresiju mRNK za mPGES-1. U eksperimentalnom modelu akutnog kolitisa (indukovanog dekstran natrijum sulfatom) pokazano je da jedan od mehanizama antiinflamatornog delovanja apigenina predstavlja i inhibicija produkcije mPGES-1 (Márquez-Flores i sar., 2016)

Među prirodnim proizvodima u inhibitoru mPGES-1 ubrajaju se i druga jedinjenja poznata po anti-inflamatornom i antitumorskom delovanju, kao što su: hiperforin iz vrste *Hypericum perforatum* L. (Koeberle i sar., 2011), garcinol iz *Garcinia indica* Choisy (Koeberle i sar., 2009c), triterpenske kiseline izolovane iz vrsta *Boswellia carterii* Birdw., *B. papyrifera* Hochst., *B. serrata* Roxb., *B. socotrana* Balf.f (npr. tiralinska, lupeolinska i bosvelinska kiselina; Verhoff i sar., 2014), diterpenoidi karnosol i karnosolna kiselina iz *Salvia officinalis* L. (Bauer i sar., 2012), embelin iz *Embelia ribes* Burm. f. (Schaible i sar., 2013), arzanol iz *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. (Bauer i sar., 2011).

Zanimljivo je da svi navedeni prirodni inhibitori mPGES-1 pri sličnim koncentracijama ometaju i aktivnost LOX-5, i tako inhibiraju, odnosno suzbijaju sintezu proinflamatornih leukotriena. Ovo dualno dejstvo ukazuju na sinergizam u anti-inflamatornoj efikasnosti i podrazumeva da su strukturne karakteristike mesta vezivanja ovih jedinjenja veoma slične kod oba enzima (Koeberle i Werz, 2015).

4.6.2.4. Polifenolna jedinjenja kao modulatori ekspresije i aktivnosti TXAS

Dokazano je i da veliki broj polifenolnih jedinjenja inhibiraju agregaciju trombocita. Nivo aktivnosti ispitivanih jedinjenja zavisi od primenjenog model sistema, te poređenje rezultata nije jednostavno. Uopšteno, smatra se da bolju aktivnost

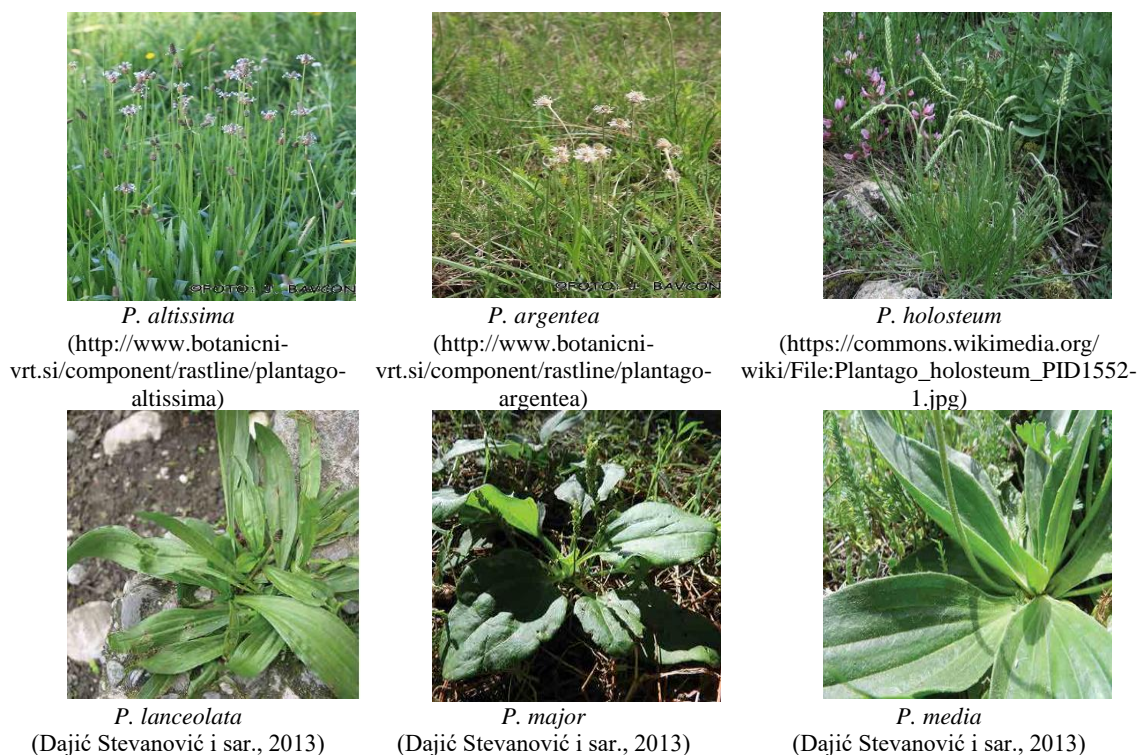
ispoljavaju aglikoni flavonoida u odnosu na metilovane, sulfonovane i glikozilovane derivate (Nardini i sar., 2007). Takođe, detaljnijim istraživanjima je utvrđeno da neka polifenolna jedinjenja inhibiraju i produkciju TXA₂: apigenin, genistein, diosmetin (Guerrero i sar., 2005), kvercetin (Tzeng i sar., 1991; Vibes i sar., 1994; Guerrero i sar., 2005; Crescente i sar., 2009; Lescano i sar., 2018), fisetin (Tzeng i sar., 1991), kemferol (Tzeng i sar., 1991), morin (Tzeng i sar., 1991), rezveratrol (Crescente i sar., 2009), katehin (Vibes i sar., 1994; Guerrero i sar., 2005), epikatehin (Vibes i sar., 1994), hiperozid (Vibes i sar., 1994), viteksin (Vibes i sar., 1994) i miricetin (Lescano i sar., 2018). Veliki broj ovih rezultata potiče iz *in vitro* ispitivanja, u kojima su korišćene mikromolarne koncentracije teško dostižne u *in vivo* uslovima.

Trenutno, prema nama dostupnim podacima, sposobnost inhibicije TXAS dokazana je samo za nekoliko polifenolnih jedinjenja. Katehini iz zelenog čaja inhibiraju TXAS (Son i sar., 2004), ali je dokazano da u trombocitima epigalokatehin galat skoro pet puta bolje inhibira COX-1 nego TXAS (Lee i sar., 2013). Takođe, dokazano je da etanolni ekstrakt pokožice luka, koji sadrži kvercetin kao dominantno jedinjenje, bolje inhibira COX-1 nego TXAS (Ro i sar., 2015). Nasuprot tome, komponente prisutne u vodenom ekstraktu crnog luka ispoljavaju bolju inhibitornu sposobnost prema TXAS nego prema COX-1 (Moon i sar., 2000). Međutim, za neka polifenolna jedinjenja, na primer apigenin, genistetin, luteolin (Guerrero i sar., 2005; Navarro-Núñez i sar., 2009), skutelarein, naringenin, krisin (Navarro-Núñez i sar., 2009) je dokazano da inhibiraju aktivnost TXA₂ vezujući se za receptore ovog jedinjenja. Pretpostavlja se su dobri antagonisti TP receptora aglikoni koji imaju dvostruku vezu između C-2 i C-3 atoma, keto funkciju u položaju 4 istog prstena i hidroksilne grupe vezane za C-7 i C-4', a da se usled metilovanja ili glikozilacije smanjuje aktivnost (Guerrero i sar., 2005; Navarro-Núñez i sar., 2009).

4.7. Hemijski sastav i biološka aktivnost odabranih vrsta roda *Plantago* L. (bokvice)

Rod *Plantago* L. (bokvice) sadrži više od 250 vrsta i predstavlja najbrojniji rod familije Plantaginaceae. Vrste roda *Plantago* su jednogodišnje ili višegodišnje, zeljaste, polužbunaste ili žbunaste biljke čiji su naizmenični ili naspramni listovi sakupljeni u prizemnu rozetu. Rastu prvenstveno u područjima umerene klime, na umerenim ili visokim nadmorskim visinama. Neke vrste su endemske za određena područja, dok su druge (*P. lanceolata* L. i *P. major* L.) globalno zastupljene ruderalne biljke (Hassemer i sar., 2017). Danas se neke od ovih vrsta plantažno gaje zbog intenzivne upotrebe u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Grigore i sar., 2015).

U Srbiji je prisutno četrnaest vrsta ovog roda (Josifović, 1974), a najpoznatije su *P. lanceolata* L. (muška ili uskolisna bokvica) i *P. major* L. (ženska ili širokolisna bokvica). U ispitivanjima izvedenim u okviru ove doktorske disertacije korišćeni su metanolni ekstrakti i infuzi šest vrsta roda *Plantago*: *P. altissima* L., *P. argentea* Chaix., *P. holosteum* Scop. (poznata i pod nazivom *P. subulata* L. Hassemer i sar., 2017), *P. lanceolata* L., *P. major* L. i *P. media* L. (Slika 4.10.).



Slika 4.10. Vrste roda *Plantago* korišćene u ispitivanjima

Hemijski sastav vrsta roda *Plantago* je izuzetno kompleksan, a smatra se da su aktivni principi ovih vrsta polisaharidi, vitamini, flavonoidi, fenolne kiseline, feniletanoidni i iridoidni glikozidi. Upravo ove klase jedinjenja su tokom godina korišćene kao hemotaksonomski markeri roda *Plantago*, a danas se smatra da su validni hemotaksonomski markeri iridoidni glikozidi (Taskova i sar., 2002). Osim ovih klasa jedinjenja, u bokvicama su detektovani i alkaloidi, kumarini, masti i ulja, sluzi i

polisaharidi, masne kiseline, terpenoidi, steroli i isparljive komponente (Fons i sar., 2008; Gonçaves i Romano, 2016). Ova jedinjenja su neravnomerno raspoređena unutar biljnih organa i njihov sastav varira tokom razvoja biljke. Masne kiseline i polisaharidi su najzastupljeniji u semenu i manje ih ima u listovima. Veliki broj ekoloških faktora utiče na sadržaj polifenolnih jedinjenja, uključujući tip zemljišta, klimu, temperaturu, osvetljenost, ali i način skladištenja biljnog materijala (Zubair i sar., 2011). Hemijski sastav vrsta ispitivanih u ovom radu je prikazan u *Tabeli 4.5*.

Tabela 4.5. Hemijski sastav odabranih vrsta roda Plantago

Klasa jedinjenja	Jedinjenja	Referenca
<i>P. altissima</i>		
Flavonoidi	Apigenin, apigenin-7- <i>O</i> -glukozid, luteolin, luteolin-7- <i>O</i> -glukozid, apiin, viteksin, ametoflavon, kemferol-3- <i>O</i> -glukozid, krizoeriol, kvercitrin, kvercetin, kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid, hiperozid, rutin, naringenin	Beara i sar., 2012; Jurišić Grubešić i sar., 2013
Fenolne kiseline	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva, vanilinska, galna, protokatehinska, siringinska, ferulna, 2,5- dihidroksibenzoeva, <i>p</i> -kumarinska, kafena, hlorogenska, cimetna, sinapinska	Beara i sar., 2012
Feniletanoidni glikozidi	Akteozid	Rønsted i sar., 2003
Kumarini	Eskuletin, skopoletin	Beara i sar., 2012;
Iridoidi	Aukubin, katalpol, 10-cinamoilkatalpol, asperulosid, globularin, genipozidinska kiselina, epiloganinska kiselina, gardozid, metilestar desacetilasperulozidinske kiseline	Handjjeva i sar., 1991; Taskova i sar., 2001; Rønsted i sar., 2003; Jurišić i sar., 2004
<i>P. argentea</i>		
Flavonoidi	Apigenin, apigenin-7- <i>O</i> -glukozid, luteolin, luteolin-7- <i>O</i> -glukozid, rutin, hiperozid, izokvercitrin, kvercitrin,	Beara i sar., 2009; Jurišić Grubešić i sar., 2013
Fenolne kiseline	Hlorogenska	Jurišić Grubešić i sar., 2013
Feniletanoidni glikozidi	Nema podataka	
Iridoidi	Aukubin, katalpol, 10-cinamoilkatalpol, asperulosid, globularin	Handjjeva i sar., 1991; Taskova i sar., 2002; Rønsted i sar., 2003, Jurišić i sar., 2004
<i>P. holosteam</i>		
Flavonoidi	Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid, luteolin, luteolin-7- <i>O</i> -glukozid, rutin, hiperozid, kvercitrin, kvercetin	Beara i sar., 2009; Janković i sar., 2012; Jurišić Grubešić i sar., 2013
Fenolne kiseline	Hlorogenska	Jurišić Grubešić i sar., 2013
Feniletanoidni glikozidi	Akteozid, arenariozid, ehinakoizid, izoakteozid, leukoskeptozid A, martinozid, 4,3''''-dimetoksiarenariozid	Janković i sar., 2012, Genc i sar., 2020b.
Iridoidi	Aukubin, 10- <i>O</i> -acetilaukubina, melitozid, monomelitozid, 10- <i>O</i> -acetylmonomelitozid	Taskova i sar., 2002; Jurišić i sar., 2004; Janković i sar., 2010, Genc i sar., 2020b.
<i>P. lanceolata</i>		
Flavonoidi	Apigenin, apigenin-6,8-di- <i>C</i> -glukozid, apigenin-7- <i>O</i> -glukozid, apigenin-7- <i>O</i> -glukuronid, apigenin-7- <i>O</i> -glukuronilglukozid, luteolin, luteolin-7- <i>O</i> -glukozid, luteolin-7- <i>O</i> -glukuronid, luteolin-7- <i>O</i> -glukuronid-3'-glukozid, luteolin-7- <i>O</i> -glukuronilglukozid, apiin, viteksin, ametoflavon, kemferol-3- <i>O</i> -glukozid, krizoeriol, kvercitrin, kvercetin, kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid, hiperozid, rutin, naringenin, eriodiktiol, hesperidin, katehin, epikatehin	Kawashty i sar., 1994; Janković i sar., 2012; Beara i sar., 2012; Varban i Varban, Kováč 2012; Ferrazzano i sar., 2015; i sar., 2015; Bahadori i sar., 2020
Fenolne kiseline	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva, vanilinska, galna, protokatehinska, siringinska, ferulna, 2,5- dihidroksibenzoeva, <i>p</i> -kumarinska, kafena, hlorogenska, cimetna, sinapinska, rozmarinska	Beara i sar., 2012; Ferrazzano i sar., 2015; Bahadori i sar., 2020

Feniletanoidni glikozidi	Akteozid, cistanosid F, lavandulifoliozid, plantamajozid i izoakteozid	Murai i sar., 1995; Rønsted i sar., 2003; Zhou i sar., 2013; Gonda i sar., 2013; Bahadori i sar., 2020
Kumarini	Eskuletin, skopoletin	Beara i sar., 2012
Lignani	Pinoresinol	Bahadori i sar., 2020
Iridoidi	Aukubin, katapol, 10-cinamolikalpol, genipozidinska kiselina, globularin, asperulosid, metilestar desacetilasperulozidinske kiseline	Handjjeva i sar., 1991; Taskova i sar., 2002; Rønsted i sar., 2003; Jurišić i sar., 2004; Janković i sar., 2010; Zhou i sar., 2013; Gonda i sar., 2013
Masne kiseline	Palmitinska, stearinska, oleinska, linolna, linoleinska,	Smith i sar., 2010
<i>P. major</i>		
Alkaloidi	Kolhicin	Kobeasy i sar., 2011
Flavonoidi	Apigenin, apigenin-6,8-di-C-glukozid, apigenin-7-O-glukozid, apigenin-7-O-glukuronid, apigenin-7-O-glukuronilglukozid, luteolin, luteolin-7-O-glukozid, luteolin-7-O-glukuronid, luteolin-7-O-glukuronid-3'-glukozid, luteolin-7-O-glukuronilglukozid, katehin, kemferol, krisin, hiperosid, naringenin, rutin, kvercetin, kvercitrin, katehin, rutin, hispidulin-7-O-glukozid	Kawashty i sar., 1994; Beara i sar., 2009; Kobeasy i sar., 2011; Mello i sar., 2012; Rico i sar., 2013; Mello i sar., 2015; Genc i sar., 2020a.
Fenolne kiseline	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva, vanilinska, galna, protokatehinska, siringinska, ferulna, 2,5- dihidroksibenzoeva, <i>p</i> -kumarinska, kafena, hlorogenska, cimetna, elagna	Kobeasy i sar., 2011; Mello i sar., 2012; Zhou i sar., 2013; Mello i sar., 2015
Feniletanoidni glikozidi	Akteozid, plantamajozid	Rønsted i sar., 2003; Zubair i sar., 2011; Zhou i sar., 2013; Gonda i sar., 2013; Genc i sar., 2020a
Iridoidi	Aukubin, genipozidinska kiselina, majorozid, 10-hidroksimajorozid, 10-acetoksimajorozid, melampirozid, gardozid, melitozid, asperulozid, plantarenalozid, iksorozid	Taskova i sar., 2002; Rønsted i sar., 2003; Zhou i sar., 2013; Gonda i sar., 2013
Triterpenske kiseline	Ursolna, oleanolna	Tarvainen i sar., 2010; Stenholm i sar., 2012; Kartini i sar., 2014
Organske kiseline	Jabučna, limunska, malonska, vinska, sukcinjska	Oleennikov i sar., 2005
Masne kiseline	Palmitinska, miristinska, stearinska, oleinska, linolna, linoleinska	Kobeasy i sar., 2011; Stenholm i sar., 2012
Ugljeni hidrati	Heteroksilani	Rønsted i sar., 2003
<i>P. media</i>		
Flavonoidi	Apigenin, rutin	Beara i sar., 2009
Fenolne kiseline	Hlorogenska, kafena	Oleennikov i sar., 2011
Feniletanoidni glikozidi	Akteozid, plantamajozid	Rønsted i sar., 2003
Iridoidi	Aukubin, 10-O-acetilaukubina, melitozid, monomelitozid, 10-O-acetilmonomelitozid	Taskova i sar., 2002; Rønsted i sar., 2003
Ugljeni hidrati	Pektinske materije i hidrofилni polisaharidini polimeri glukoze, galaktoze, manoze, ksiloze, araboza	Oleennikov i sar., 2011; Lukova i sar., 2018
Masne kiseline	Palmitinska, stearinska, oleinska, linolna, linoleinska	Smith i sar., 2014

Feniletanoidni glikozidi su dominantna polifenolna jedinjenja u bokvicama. Neki od njih su prvi put izolovani iz različitih vrsta bokvica, pa su po njima dobili ime, na primer plantamajozid po *P. major*. U najvećem broju vrsta su detektovani plantamajozid i verbaskozid (poznat i pod nazivom akteozid). Smatra se da su upravo ova jedinjenja nosioci mnogih bioloških aktivnosti bokvica. U *in vivo* ispitivanjima na miševima kojima je indukovana edem uha ili kolitis dokazano je anti-inflamatorno delovanje feniletanoidnih glikozida (Murai i sar., 1995; Hausmann i sar., 2007; Wu i sar., 2016). Jedan od mehanizama anti-inflamatornog delovanja plantamajozida je inhibicija MAPK i NF- κ B signalnih kaskada (Wu i sar., 2016). Osim toga, plantamajozid i verbaskozid

ispoljavaju i antioksidantno, antibakterijsko, antikancerogeno, hempreventivno i nefroprotektivno delovanje (Alipieva i sar., 2014; Jung i sar., 2015; Pei i sar., 2015; Ravn i sar., 2015).

Iridoidi koji se koriste kao taksonomski marker su aukubin, katalpol, bartziozid i planarenalozid. Aukubin je detektovan u skoro svim vrstama, bartziozid i planarenalozid su uglavnom prisutni u podrodu *Psyllium*, dok je kalatpol karakteristika podroda *Albicans* (Ronsted i sar., 2003). Anti-inflamatorno delovanje ovih jedinjenja dokazano je *in vivo* na miševima kojima je indukovano edem uha (Carrillo-Ocampo i sar., 2013). U *in vitro* eksperimentu je pokazano da aukubin isopoljava sedam puta bolju inhibiciju COX-2 nego COX-1 (Park i sar., 2010).

Polisaharidi su prisutni prvenstveno u semenu različitih vrsta roda *Plantago*, ispoljavaju niz bioloških aktivnosti kao što su, antioksidantna, anti-inflamatorna, imunomodulatorna, hepatoprotektivna, renoprotektivna, hipolipidemijska, hipoglikemijska, antitumorska (Ji i sar., 2019)

Blagotvorna dejstva vrsta roda *Plantago* L., prepoznata u etnomedicini mnogih zemalja, prihvatila je i moderna medicina. Najširi dijapazon primene zabeležen je za vrste *P. asiatica* L., *P. afra* L., *P. indica* L., *P. lanceolata*, *P. major* i *P. ovata* Forsk. *P. asiatica* je poznata po anti-inflamatornom, antipiretičkom, antitusivnom i hipolipidemijskom delovanju. Kliničkim studijama potvrđeno je laksativno delovanje semena vrsta *P. asiatica*, *P. afra*, *P. indica* i *P. ovata*, a u tradicionalnoj medicini zabeležena je njihova primena i kao antitusiva, ekspektoransa i diuretika (WHO 1999; Haddadian i sar., 2014; Gonçalves i Romano, 2016; Ji i sar., 2019).

U tradicionalnoj medicini list *P. lanceolata* se upotrebljava za tretman produktivnog kašlja, ulceracija, konjuktivitisa, bolesti respiratornog, gastrointestinalnog i urinarnog trakta i za stimulisanje zarastanja rana. Po podacima Evropske medicinske agencije iz 2012. godine, na tržištu Evrope je bilo prisutno više od dvadeset preparata na bazi ove biljne vrste, namenjenih prvenstveno za ublažavanje nadražaja katara gornjih disajnih puteva i lečenje zapaljenja usta i grla (Wiesner, 2012). Zbog antioksidantnog, antibakterijskog i anti-inflamatornog delovanja, *P. lanceolata* se upotrebljava i u kozmetičkoj industriji za stimulaciju produkcije kolagena i poboljšanje izgleda kože (Grigore i sar., 2015).

Jedna od najpoznatijih primena *P. major* je za zarastanje rana, ali koristi se i u tretmanu drugih kožnih problema (dermatitis, opekotine, posekotine, akne, apscesi, ubod pčela i osa). Služi kao medikament u tretmanu bolesti respiratornog trakta (astme, bronhitisa), digestivnih organa (konstipacija, dijareja, gastritis ili čir na želudcu), urogenitalnog sistema (kamen u bubregu, menstrualni poremećaji, infekcije urinarnog trakta) i mnogih drugih patoloških stanja (Samuelsen, 2000; Haddadian i sar., 2014).

Osim u tradicionalnoj medicini, bokvice su zastupljene i u ishrani u vidu čajeva (*P. asiatica*, *P. lanceolata*, *P. major*), dodataka u jogurtu (*P. asiatica*), salata (*P. coronopus*, *P. lanceolata*, *P. serraria*), priloga ili začina (Heimler i sar., 2007; Gonçalves i Romano, 2016; Ji i sar., 2019). Zahvaljujući rasprostranjenosti upotrebi, fitohemijska karakterizacija i farmakološki potencijal vrsta roda *Plantago* su atraktivan predmet naučnih istraživanja. U Tabeli 4.6. dat je pregled bioloških aktivnosti bokvica koje su korišćene u ovom radu.

Tabela 4.6. Biološka aktivnost odabranih vrsta roda *Plantago*

Biološka aktivnost	Deo biljke	Model /Metoda	Referenca
<i>P. altissima</i>			
Antioksidantna	Metanolni ekstrakt* herbe	Spektrofotometrijske <i>in vitro</i> metode (neutralizacija DPPH [•] , HO [•] , O ₂ ^{•-} i NO; određivanje inhibicije lipidne peroksidacije i redukcionog potencijala)	Beara i sar., 2012.
Anti-inflamatorna	Metanoni ekstrakt herbe	<i>Ex vivo</i> COX-1 i 12-LOX u humanim trombocitima	Beara i sar., 2012
<i>P. argentea</i>			
Antioksidantna	Metanolni ekstrakt herbe	Spektrofotometrijske <i>in vitro</i> metode (neutralizacija DPPH [•] , HO [•] , O ₂ ^{•-} i NO; određivanje inhibicije lipidne peroksidacije i redukcionog potencijala)	Beara i sar., 2009
<i>P. holosteum</i>			
Antioksidantna	Metanolni ekstrakt herbe	Spektrofotometrijske <i>in vitro</i> metode (neutralizacija DPPH [•] , HO [•] , O ₂ ^{•-} i NO; određivanje inhibicije lipidne peroksidacije i redukcionog potencijala)	Beara i sar., 2009
Anti-inflamatorna	Frakcije metanolnog ekstrakta herbe	<i>In vitro</i> - praćenje inhibicije produkcije NO, PGE ₂ i TNF α RAW 264 makrofagnoj ćelijskoj liniji miševa	Genc i sar., 2019
<i>P. lanceolata</i>			
Antioksidantna	Metanolni ekstrakt semena; metanolni ekstrakt semena, stabljike, lista i cveta; metanolni ekstrakt herbe; metanolni ekstrakt lista; heksanski, etilacetatni, vodeni i metanolni ekstrakt herbe	Spektrofotometrijske <i>in vitro</i> metode (neutralizacija ABTS ^{•+} , DPPH [•] , HO [•] i NO; određivanje inhibicije lipidne peroksidacije i redukcionog potencijala)	Galvez i sar., 2005; Vigo i sar., 2005; Beara i sar., 2012; Dalar i sar., 2012; Zhou i sar., 2013; Lukova i sar., 2018; Bahadori i sar., 2020
	Metanolni ekstrakt semena	<i>In vitro</i> ćelijska antioksidantna aktivnost	Zhou i sar., 2013
Citotoksična	Metanolni ekstrakt lista; metanolni ekstrakt herbe; etanolni ekstrakt herbe	Spektrofotometrijske <i>in vitro</i> metode (MTT i SRB esej)	Galvez i sar., 2003; Vigo i sar., 2005; Beara i sar., 2012
	Etanolni ekstrakt herbe	<i>In vitro</i> praćenje inhibicije produkcije NO i PGE ₂ i ekspresije iNOS, COX-1 i COX- u J774A.1 makrofagnoj ćelijskoj liniji miševa	Vigo i sar., 2005
Anti-inflamatorna	Metanolni ekstrakt semena	<i>In vitro</i> praćenje inhibicije ekspresije IL-1 β , IL-6, COX-2 u LPS-stimulisanim RAW 264.7 makrofagama	Zhou i sar., 2013
	Dihormetanski i metanolni ekstrakt lista	<i>In vitro</i> praćenje inhibicije NF-kB signalne kaskade u HEK293 ćelijskoj liniji stimulisanog TNF α	Vogl i sar., 2013
	Tečni ekstrakti	Modifikovani test natrijum-dodecil sulfatom indukovane iritacije horioalantične membrane kokošijeg jajeta (HET-CAM)	Marchesan i sar., 1998
	Heksanski ekstrakt listova	<i>In vivo</i> karaginanom indukovani edem šape; izolovani enzimi	Fakhrudin i sar., 2017
	Metanoni ekstrakt herbe	<i>Ex vivo</i> COX-1 i 12-LOX u humanim trombocitima	Beara i sar., 2010; Beara i sar., 2012
Antibakterijska	Vodeni ekstrakt (infuz) cveta, lista i korena	<i>In vitro</i> : <i>Styptococcus bovis</i> , <i>S. Mitis</i> , <i>S. Mutants</i> , <i>S. Sobrinus</i> ,	Ferrazzano i sar., 2015

		<i>S. Parasanguinus, Lacobacillus casei</i> Kliničke studije: uticaj na bakterije usne duplje	
	Petroletarski, metanolni i hloroform-metanoni (1:1) ekstrakt lista	<i>In vitro: Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Escherichia coli, Salmonella thyphei</i>	Fayera i sar., 2018
Antifungalna	Petroletarski, metanolni i hloroform-metanoni (1:1) ekstrakt lista	<i>In vitro: Aspergillus niger, Fusarium solani</i>	Fayera i sar., 2018
Zarastanje rana	Vodeni ekstrakt cveta	<i>In vivo</i> indukovana posekotina na ledima pacova	Farahpour i sar., 2012
Antispazmolitička	Etanolni ekstrakt	<i>Ex vivo</i> traheja zamorčića	Fleer i Verspohl, 2007
Antitusivna	Etanolni ekstrakt herbe	<i>In vivo</i> aerosolom limunske kiseline izazvan kašalj zamoraca	Boskabady i sar., 2006
<i>P. major</i>			
Antioksidantna	Metanolni ekstrakt semena; vodeni ekstrakt herbe, etanolni ekstrakt lista; etanolni i vodeni ekstrakti lista i semena; metanolni ekstrakt herbe; metanolni i vodeni ekstrakti stabljike, lista, korena i semena	Spektrofotometrijske <i>in vitro</i> metode (neutralizacija ABTS ⁺ , DPPH [•] , HO [•] i NO; određivanje inhibicije lipidne peroksidacije i redukcionog potencijala)	Pourmorad i sar., 2006; Ivanova i sar., 2005; Stanisavljević i sar., 2008; Beara i sar., 2009; Kobeasy i sar., 2011; Kolak i sar., 2011; Kartini i sar., 2014; Zhou i sar., 2013; Lukova i sar., 2018
	Metanolni ekstrakt semena	<i>In vitro</i> ćelijska antioksidantna aktivnost	Zhou i sar., 2013
	Etanolni ekstrakt lista	<i>In vivo</i> praćenje MDA, superoksid dismutaze i gutationa nakon acetoamnofenom izazvanog oštećenja jetre pacova	Hussan i sar., 2015a
	Metanolni, etanolni, etilacetatni, heksanski i dihlormetanski ekstrakt herbe	<i>Ex vivo</i> izolovane mitohondrije jetre pacova	Mello i sar., 2012; Mello i sar., 2015
Citotoksična	Vodeni ekstrakt cele biljke, etanolni i vodeni ekstrakti lista i semena, metanolni i vodeni ekstrakti stabljike, lista, korena i semena	Spektrofotometrijske <i>in vitro</i> metode (MTT, XTT i SRB esej)	Chiang i sar., 2002; Galvez i sar., 2003; Kobeasy i sar., 2011; Kartini i sar., 2014; Poor i sar., 2017
Anti-inflamatorna	Metanolni ekstrakt semena	<i>In vitro</i> praćenje inhibicije ekspresije IL-1 β , IL-6, COX-2 u LPS-stimulisanim RAW 264.7 makrofagama	Zhou i sar., 2013
	Vodeni, metanoni i etanolni ekstrakt lista	<i>In vivo</i> praćenje sniženja TNF α i IL-1 α nakon acetoamnofenom izazvanog oštećenja jetre pacova	Hussan i sar., 2015b
	Frakcije dobijene ekstrakcijom superkričnim fluidima, etanolna i heptanska frakcija dihlormetanskog ekstrakta cele biljke	Izolovani COX-1 i COX-2 enzimi	Stenholm i sar., 2012
	Vodeni ekstrakt lista	<i>In vivo</i> karaginanom indukvan edem šape i krotonovim uljem indukovaan edem šape i uha	Núñez Guillén i sar., 2007/1997
	Metanoli ekstrakt semena	<i>In vivo</i> karaginanom indukvan edem šape	Turel i sar., 2009
	Metanolni i vodeni ekstrakti stabljike, lista, korena i semena	<i>In vitro</i> praćenje ekspresije IL-1 β , IL-6, TNF α i IFN- γ - u LPS-stimulisanim THP-1	Kartini i sar., 2017

		makrofagama	
	Etanolni i vodeni ekstrakti stabljike, lista, korena i semena	<i>In vitro</i> LPS-stimulirane H400 oralne epitelne ćelije	Zubair i sar., 2017
	Metanoni ekstrakt herbe	<i>Ex vivo</i> COX-1 i 12-LOX u humanim trombocitima	Beara i sar., 2012
Analgetska	Vodeni ekstrakt lista	<i>In vivo</i> Test grčenja (<i>Writhing test</i>) i Tail Flick test	Núñez Guillén i sar., 1997
Antitumorska	Vodeni ekstrakt (infuz) lista	<i>In vivo</i> na miševima u kojima je izazvan razvoj <i>Ehrlich Ascites Tumora</i>	Ozaslan i sar., 2007
Antimukozna (ublažava oralni mukozitis)	Sirup	Klinička studija: pacijeti oboleli od kancera vrata i glave	Soltani i sar., 2020
Antiviralna	Vodeni ekstrakt cele biljke	Virus herpesa (HSV-2)	Chiang i sar., 2002; Chiang i sar., 2003
Antibakterijska	Etanolni i acetonski ekstrakt lista; metanolni, vodeni i etanolni ekstrakt cele biljke	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> i <i>Proteus mirabilis</i> .	Velasco-Lezama i sar., 2006; Sharifa i sar., 2008; Stanisavljević i sar., 2008; Metiner i sar., 2012
Antifungalna	Etanolni ekstrakt lista	<i>Candida krusei</i> , <i>Candida albicans</i>	Holetz i sar., 2002; Stanisavljević i sar., 2008
Proliferativna	Heksanski, vodeni, metanolni, hloroformski ekstrakti herbe	Limfociti	Velasco-Lezama i sar., 2006
Stimulacija zarastanja rana	Liofilizarni vodeni ekstrakt lista, etanolni ekstrakt lista	<i>In vivo</i> indukovana posekotina na leđima pacova	Mahmood i Phipps, 2006; Thome i sar., 2012
	Vodeni ekstrakt semena	<i>In vivo</i> indukovana opekotina na leđima pacova	Amini i sar., 2010
	Vodeni i etanolni ekstrakti suvih i svežih listova	<i>In vitro scratch assay</i> efekat zarastanja rane (epitelizacije) oralnih epitelnih ćelija	Zubair i sar., 2012
	Vodeni i etanolni ekstrakti suvih i svežih listova	<i>Ex vivo</i> uši svinje kao eksperimentalni model rane	Zubair i sar., 2016
	Metanolni ekstrakt herbe	<i>In vitro</i> elasataze, kolagenaze, hijluronidaze	Genc i sar., 2020
Antihipertenzivna	Frakcije metanolnog ekstrakta lista	<i>In vitro</i> angiotenzin I konvertujući enzim	Nhiem i sar., 2011
Hipoglikemijska	Vodeni ekstrakt lista	<i>In vivo</i> aloksanom indukovani dijabetes	Noor i sar., 2000
<i>P. media</i>			
Antioksidantna	Metanolni ekstrakt herbe, etanolni ekstrakt i frakcije etanolnog ekstrakta lista	Spektrofotometrijske <i>in vitro</i> metode (neutralizacija DPPH*, HO* i NO; određivanje inhibicije lipidne peroksidacije i redukcionog potencijala)	Beara i sar., 2009; Olennikov i sar., 2011; Lukova i sar., 2018
Antiaterogena	Frakcije vodorastvornih polisaharida i frakcije pektinskih supstanci	<i>Ex vivo</i> serum zdravih donora	Olennikov i sar., 2011

*Ekstrakti su nazvani po prvom ekstragensu, a nije naznačen udeo vode u nekim rastvaračima.

4.8. Hemijski sastav i biološka aktivnost *Merlot* vina

Stil života i ishrana preventivno deluju na razvoj nekih od najtežih bolesti današnjice, kao što su kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti ili kancer (Pavlidou i sar., 2018). Sve više ljudi je upoznato sa pojmom funkcionalne hrane, hrane koje osim nutritivnih vrednosti ima i blagotvorni efekat na zdravlje. Istraživanja tržišta su pokazala da potrošači u Americi (Higgins i Llanos, 2015) i Evropi (Vecchio i sar., 2017) smatraju da je vino zdravije od drugih alkoholnih pića i da pozitivno deluje na kardiovaskularni sistem. Zbog toga je vino jedno od najpopularnijih pića, koje se konzumira iz hedonističkih, ali i iz zdravstvenih razloga.

Blagotvorni efekti vina poznati su još iz antičkog doba, kada se vino koristilo za ublažavanje bolova, stomačnih problema, promena na koži ili kao atiseptik (Guilford i Pezzuto, 2011). Međutim, popularnost vina, ali i broj istraživanja biološkog delovanja vina, znatno su porasli početkom poslednje decenije prošlog veka kada je uveden pojam *Francuski paradoks*. Tačnije, utvrđeno da Francuzi manje oboljevaju od kardiovaskularnih bolesti u odnosu na stanovnike drugih razvijenih država (Velika Britanija, SAD, Nemačka), iako konzumiraju hranu bogatu zasićenim mastima. Pretpostavljeno je da je razlog svakodnevno konzumiranje crvenog vina (Renaud i Lorigeril, 1992).

Međutim, blagotvorne efekte može da ima samo umereno konzumiranje vina, jer alkohol prisutan u vinu može da ispoljava neželjene efekte. Čak jedna desetina odraslih osoba (24-60 godina) premine usled prevelikog unosa alkohola. U SAD umerena konzumacija vina podrazumeva najviše jednu čašu vina dnevno (14 g alkohola, ili približno 150 mL vina) za žene, a dve čaše (300 mL) za muškarce, dok je u Velikoj Britaniji preporučena doza za oba pola jedna čaša nedeljno (Guilford i Pezzuto, 2011; Pavlidou i sar., 2018).

Vino može da se proizvodi od različitog bobičastog voća, ali se najčešće proizvodi od grožđa, tj. ploda vrste *Vitis vinifera* L. *V. vinifera* je i najzastupljeniji i ekonomski najznačajniji predstavnik roda *Vitis* koji obuhvata više od 60 vrsta rasprostranjenih pretežno na severnoj hemisferi. Postoji više od hiljadu sorti ove vrste, koje se razlikuju po morfološkim karakteristikama (veličina listova, grozdova, bobica, sadržaj šećera), a najpoznatije su Šardone (Chardonnay), Kaberne Sovinjon (Cabernet Sauvignon), Širaz (Syraz) i Merlo (*Merlot*; This i sar., 2006). U ovom radu su ispitivani uzorci *Merlot* vina iz različitih evropskih zemalja.

Merlot sorta je poreklom iz Francuske, ali danas je globalno rasprostranjena. Koristi se za proizvodnju kvalitetnih crvenih vina. Kvalitet vina uslovljen je hemijskim sastavom, jer komponente prisutne u vinu doprinose organoleptičkim svojstvima vina - aromi, boji, mirisu i ukusu. Istovremeno, analizom hemijskog sastava može se utvrditi poreklo i autentičnost vina. Polifenolna jedinjenja su jedna od najznačajnijih komponenti vina, a njihov sastav u vinu osim od sorte grožđa i procesa vinifikacije, zavisi i od klimatskih i edafskih faktora. Klase polifenolnih jedinjenja su neravnomerno distribuirane u biljkama, pa su tako u pokožici grožđa prisutni antocijani i tanini, u semenu tanini, a u pulpi pretežno fenolne kiseline. Uopšteno, crvena vina imaju bogatiji

hemijski sastav u odnosu na bela vina zbog samog procesa vinifikacije. Naime, pri proizvodnji crvenih vina, vrši se fermentacija bobica grožđa bez odvajanja pokožice i semenki, usled čega se jedinjenja prisutna u ovim delovima grožđa ekstrahuju u vino (Paixão i sar., 2007; Chira i sar., 2011; González-Barreiro i sar., 2015). Pregled polifenolnih jedinjenja prisutnih u *Merlot* vinu dat je u Tabeli 4.7., a u nastavku će biti reči o klasama koje doprinose kvalitetu vina.

Tabela 4.7. Polifenolna jedinjenja detektovana u *Merlot* vinu

Klase polifenolnih jedinjenja	Polifenolna jedinjenja detektovana u <i>Merlot</i> vinu	Referenca
Flavonoidi		
Flavonoli	Kvercetin, miricetin, kemferol, rutin, izoramnetin, laricitrin, siringetin, izokvercetin, izoramnetin, kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid, miricetin-3- <i>O</i> -glukozid, laricitrin-3- <i>O</i> -glukozid, siringetin-3- <i>O</i> -glukozid	La Tore i sar., 2006; Granato i sar., 2011; Gris i sar., 2013; Ivanova-Petropolis i sar., 2015b; Lingua i sar., 2016
Flavan-3-oli	Katehin, epikatehin, galokatehin, epigalokatehin, epikatehin galat	Anli i Vural, 2009; Granato i sar., 2011; Gris i sar., 2011; Šeruga i sar., 2011; Gris i sar., 2013; Ivanova-Petropolis i sar., 2015b; Lingua i sar., 2016
Antocijanini	Malvidin-3-glukozid, delfinidin-3-glukozid., cijanidin-3-glukozid, peonidin-3-glukozid, petunidin-3-glukozid, malvidin-3-(6-acetil)-glukozid, delfinidin-3-(6-acetil)-glukozid, cijanidin-3-(6-acetil)-glukozid, peonidin-3-(6-acetil)-glukozid, petunidin-3-(6-acetil)-glukozid, malvidin-3-(6-kumaril)-glukozid, delfinidin-3-(6-kumaril)-glukozid, cijanidin-3-(6-kumaril)-glukozid, peonidin-3-(6-kumaril)-glukozid, petunidin-3-(6-kumaril)-glukozid	Gris i sar., 2013; Mitić i sar., 2014; Ivanova-Petropolis i sar., 2015a; Ivanova-Petropolis i sar., 2015b; Lingua i sar., 2016
Proantocijanidini	Proantocijanidin B1, proantocijanidin B2	La Tore i sar., 2006; Gris i sar., 2011; Chira i sar., 2011; Ivanova-Petropolis i sar., 2015b,
Neflavonoidi		
Derivati benzojeve kiseline	<i>p</i> -Hidroksibenzojeva, galna, vanilinska, siringinska kiselina	La Tore i sar., 2006; Anli i Vural, 2009; Rastija i sar., 2009; Granato i sar., 2011; Gris i sar., 2013; Van Leeuw i sar., 2014; Ivanova-Petropolis i sar., 2015a; Ivanova-Petropolis i sar., 2015b; Lingua i sar., 2016
Derivati cimetine kiseline	Kafena, <i>p</i> -kumarinska, ferulna kiselina	La Tore i sar., 2006; Rastija i sar., 2009; Granato i sar., 2011; Šeruga i sar., 2011; Gris i sar., 2013; Ivanova-Petropolis i sar., 2015a; Ivanova-Petropolis i sar., 2015b; Lingua i sar., 2016
Stilbeni	<i>Trans</i> -rezveratrol, <i>trans</i> -piceid, <i>cis</i> -rezveratrol, <i>cis</i> -piceid	Rastija i sar., 2009; Granato i sar., 2011; Van Leeuw i sar., 2014; Lingua i sar., 2016

Antocijani su biljni pigmenti odgovorni za boju grožđa i vina. Aglikoni antocijana su antocijanidini, a njihove glikozidne forme su antocijanini. U grožđu i vinu su dominantni monoglukozidni antocijanini ili monoglukozidni antocijanini acetilovani *p*-kumarnom, kafenom ili sirćetnom kiselinom. Hemijske struktura antocijanidina (stepen hidroksilacije i metilacije), određuje boju, odnosno roza, crvene, plave i ljubičaste tonove grožđa i vina. Tokom vinifikacije i starenja vina, antocijani interaguju sa drugim

komponentama prisutnim u vinu i podležu različitim reakcijama (oksidacije, hidrolize, taloženja, polimerizacije) koje utiču na boju vina. Antocijani mogu da se koriste i kao hemotaksonomski markeri različitih sorti grožđa (He i sar., 2010; Dimitrovska i sar., 2013; Garrido i Borges, 2013).

Jedna od osnovnih organoleptičkih karakteristika vina je adstringentnost, za koju su odgovorni tanini. Razlikuju se hidrolizujuću i kondezovani tanini. Smatra se da kondenzovani tanini u vino dospevaju iz pokožice i semena grožđa tokom fermentacije. Sa druge strane, izvor hidrolizujućih tanina je drvo, najčešće hrastovo, od kog su napravljeni sudovi za čuvanje vina. Kondezovani tanini ili proantocijanidini su polimeri flavan-3-ola: (+)-katehina, (-)-epikatehina, (+)-galokatehina, epiokatehin galata i (-)-epigalokatehin galata. Procijanidini male molekulske mase daju gorak ukus vinu, dok veliki polimeri dopriose osećaju adstringentnosti, odnosno skupljanju usta usled taloženja proteina. Kao i antocijani, i tanini podležu reakcijama polimerizacije, usled čega će se razlikovati ukus odležalih od mladih vina (Chira i sar., 2011; Gris i sar., 2011; Garrido i Borges, 2013).

U vinu su prisutni i derivati hidroksibenzoeve i hidroksicimentne kiseline. Galna kiselina je dominantna hidroksibenzoeva kiselina, dok su hidroksicimentne kiseline pretežno prisutne u vidu estara vinske kiseline. Hidroksicimentne kiseline doprinose promeni boje, odnosno tamnjenju vina tokom starenja. Takođe, doprinose aromi vina jer su prekursori različitih volatilnih jedinjenja (Garrido i Borges, 2013; González-Barreiro i sar., 2015).

Osim ukusa, aroma je jedna od osnovnih odlika kvaliteta vina. Kombinacija sortnih karakteristika i metabolizma grožđa, uslova gajenja, zemljišta, klime i procesa vinifikacije daje jedinstvenu aromu vinu. Detektovano je više od hiljadu isparljivih komponenti vina, koje su, po hemijskoj strukturi, mešavina nekoliko grupa jedinjenja: viših aldehida, viših alkohola, viših masnih kiselina, ketona, terpena i estara. Na primer, u *Merlot* vinu iz Brazila, dominantne isparljive komponente su bili etilestri masnih kiselina (etil-oktanoat i etil-heksanoat), etilcinamat, i alkohol (1-heksanol), koje su ovom vinu dale voćnu, slatkastu i biljnu aromu (González-Barreiro i sar., 2015; Arcari i sar., 2017).

Smatra se da su glavni nosioci biološke aktivnosti vina polifenolna jedinjenja. Aktivnost kvercetina (Stewart i sar., 2008; Tribolo i sar., 2008) i rezveratrola (Su i sar., 2006; Spanier i sar., 2009) je veoma često ispitivana i korelirana sa aktivnošću vina. Tokom *in vitro* ispitivanja, često su bili zanemareni međusobni efekti komponenti prisutnih u vinu, njihov metabolizam i koncentracije dostupne u krvi. Međutim, i rezultati *in vivo* ispitivanja pokazuju da ova jedinjenja ispoljavaju širok spektar bioloških aktivnosti: antioksidantnu, antimikrobnu, neuroprotektivnu, hipoglikemijsku, antikanceru, imunomodulatornu, anti-inflamatornu.

Dugo se smatralo da je za *Francuski paradoks* odgovorno antioksidantno delovanje vina, ali danas se zna da je za kardioprotektivno delovanje podjednako važan i anti-inflamatorni, hipolipidemijski i antiaterogeni efekat vina. Naime, u patogenezi ateroskleroze, jedne od najčešćih bolesti vaskularnog sistema, ključne uloge imaju i oksidativni stres i inflamacija. Razvoj ateroskleroze obuhvata sledeće faze: endotelnu disfunkciju praćenu infiltracijom LDL-a i monocita u endotelijum, oksidaciju LDL,

transformaciju monocita u makrofage i penaste ćelije, migraciju i proliferaciju glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova, privlačenje trombocita i nastanak tromba. Epidemiološke studije pokazuju da je usled savremenog načina života ateroskleroza sve rasprostranjenija, a da je povezana i sa nastankom drugih kardiovaskularnih bolesti, koje su jedan od vodećih uzroka mortaliteta (Tedgui i Mallat, 2006; Fragopoulou i Antonopoulou, 2020).

Iako je mehanizam anti-inflamatornog delovanja polifenola iz vina delimično poznat, anti-inflamatorno delovanje vina je bilo predmet ispitivanja samo nekoliko *in vitro* studija. Nunes i saradnici (2013) su ispitivali anti-inflamatorni potencijal ekstrakt crvenog vina na HT-29 ćelijskoj liniji (epitelne tumorske ćelije debelog creva), gde je inflamacija izazvana dodatkom citokina. Rezultati su pokazali da crveno vino ispoljava dozno zavisnu inhibiciju degradacije I κ B, a time i inhibiciju NF- κ B signalne kaskade, kao i inhibiciju ekspresije COX-2 i iNOS proteina. Isti grupa autora ispitala je i dokazala još jedan mehanizam anti-inflamatornog delovanja vina, inhibicija JAK/STAT i aktivacija Nrf2 transduccionog puta (Nunes i sar., 2015). Eksperimenti na izolovanim enzimima (COX-1, COX-2, 5-LOX) su pokazali da, iako inhibiraju COX-2, vina ispoljavaju i COX-1 inhibiciju. Ovakvi rezultati pokazuju da vino, kao i aspirin može da inhibira COX-1, i time smanjuje rizik od tromboze (Kutil i sar., 2014).

Ispitivanjima na zdravim i tumorskim ćelijama debelog creva dokazano je da vino supresuje produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta, kao i ekspresiju adhezionih molekula i NF- κ B (Angel-Morales i sar., 2012; Calabriso i sar., 2016). Osim što inhibira ekspresiju adhezionih molekula, pokazano je da ekstrakt vina sprečava interakciju monocita sa endotelnim ćelijama, što predstavlja mehanizam kojim vino može da sprečava aterosklerozu (Calabriso i sar., 2016).

Fragopoulou i saradnici (2020) su pokazali da ekstrakti crvenog i belog vina inhibiraju agregaciju trombocita izazvanu različitim stimulusima, kao i produkciju proinflamatornih citokina (TNF α i IL-1 β). Sposobnost vina da inhibira agregaciju trombocita je dokazana u još nekoliko *in vitro* i *in vivo* studija čije je pregled dat u radu Fragopoulou i Antonopoulou (2020). *Ex vivo* ispitivanja aktivnosti nealkoholnog ekstrakta vina „Provinols™“ su dala zanimljive rezultate. Naime, u radu Diebolt-a i saradnika (2001) pokazano je da je „Provinols™“ povećao ekspresiju COX-2 i produkciju TXA₂ u endotelnim ćelijama aorte. Sa druge strane, rezultati Agounija i saradnika iz 2017. godine pokazuju da je „Provinols™“ u aortama smanjio produkciju TXA₂ i 8-izoprostana, a nije uticao na produkciju PGE₂ i PGI₂, dok je u malim mesenteričnim aortama smanjio produkciju 8-izoprostana i PGE₂, a nije uticao na produkciju TXA₂ i PGI₂. Takođe, uticaj „Provinols™“a na ekspresiju COX-2 i NF- κ B p65 je bio različit u aortama, gde je ekspresija COX-2 i NF- κ B p65 bila smanjena, i u malim mesenteričnim aortama, gde je bila povećana ekspresija COX-2, a nepromenjena ekspresija NF- κ B p65. Ekspresija COX-1 je bila konstantna u oba model sistema. Na osnovu ovih rezultata može se jedino zaključiti da nealkoholni ekstrakt vina modulira ciklooksigenazni put, ali su neophodna dalja istraživanja kako bi se utvrdio tačan mehanizam delovanja.

Zahvaljujući velikoj zastupljenosti u ishrani i relativno maloj toksičnosti, biološki potencijal vina je bio predmet mnogobrojnih epidemioloških studija. Anti-inflamatorno

delovanje vina je ispitivano praćenjem uticaja na nivo C-reaktivnog proteina, adhezionih molekula ili interleukina. U nekim slučajevima, konzumiranje vina je rezultovalo povišenim nivom IL-6 (Williams i sar., 2004; Karlsen i sar., 2005). Iako rezultati navedenih studija nisu uniformni, veliki broj epidemioloških studija potvrđuje antioksidantni, hipolipidemijski i anti-inflamatorni efekat, koji zajedno doprinose kardioprotektivnom delovanju vina. Pregled epidemioloških studija prikazan je u radovima Guilford i Pezzuto (2011), Pavlidou i saradnici (2018) i Fragopoulou i Antonopoulou (2020).

5. Eksperimentalni deo

5.1. Reagensi i instrumenti korišćeni u eksperimentalnom radu

Model sistem u ovom radu predstavljala je humana leukemijska mijelomonocitna ćelijska linija (U937 ćelije). Ćelije su dobijene od dr Snežana Kojić sa Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGE), Univerziteta u Beogradu.

Za određivanje hemijskog sastava ispitivanih ekstrakata i biološke aktivnosti korišćeni su standardi, reagensi i rastvarači analitičke čistoće (*Tabela 5.1.*).

Tabela 5.1. Proizvođači reagenasa, standarda i rastvarača korišćenih u eksperimentalnom radu

Proizvođač	Reagensi, standardi i rastvarači
Alfa Aesar, Velika Britanija	Galna kiselina
Ambion, Thermo Fisher, SAD	DNase I (RNase-free) Kit
AppliChem, Nemačka	Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid hlorid, delfinidin-3- <i>O</i> -glukozid hlorid, dietil pirokarbonat (DEPC), malvidin-3- <i>O</i> -glukozid
Applied Biosystems, Thermo Fisher, SAD	High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Power SYBR Green PCR Master Mix
Centrohem, Srbija	AlCl ₃ , CH ₃ COONa, KCl, limunska kiselina, natrijum-citrat, Na ₂ CO ₃
ChromDex, SAD	Kemferol
Extrasynthese, Francuska	Apigenin, apigenin-7- <i>O</i> -glukuronid, izoramnetin, luteolin, luteolin-7- <i>O</i> -glukozid, luteolin-7- <i>O</i> -glukuronid, verbaskozid, ursolna kiselina
Fitolaba, Nemačka	Petunidin-3- <i>O</i> -glukozid hlorid, peonidin-3- <i>O</i> -glukozid hlorid
Fluka, Nemačka	Ferulna kiselina, forbol 12-miristat 13-acetat (PMA), naringenin, miricetin, rutin, viteksin
Gibco, USA	Fetalni goveđi serum (FBS)
Invitrogen, Thermo Fisher, SAD	Prajmeri za cPLA ₂ α, COX-1, COX-2, GAPDH; Qubit RNA BR Assay Kit
J.T. Baker, SAD	Dimetil-sufoksid (DMSO), etanol, hloroform, izopropanol, metanol, metanol <i>HPLC grade</i>
Lach-Ner, Češka	Benzoeva kiselina, mravlja kiselina
Merck, Nemačka	SC-560
Metabion, Nemačka	Prajmeri cPGES
Promochem LGC, Nemačka	Metanol i acetonitril <i>HPLC grade</i>
Roth, Nemačka	Apiin, apigenin-7- <i>O</i> -glukozid, 35% hlorovodonična kiselina, arahidonska kiselina, aukubin, eskuletin, hiperozid, izoskopoletin, protokatehinska kiselina
Sigma-Aldrich, Nemačka	Antibiotik/antimikotik (10000 U penicilin, 10 mg streptomycin i 25 mg amfotericin B u 1 ml), arahidonska kiselina, Folin-Ciocalteu (FC) reagens, lipopolisaharid (LPS iz <i>Escherichia coli</i> O111: B4), kalcijumova jonofora A23187, medijum RPMI-1640 (sa 2.05 mmol/L L-glutamina i 25 mmol/L HEPES), polivinilpolipirrolidon, PGB ₂ , PGE ₂ , PMA, tripan plavo, TRI reagens (TRIzol [®]), TXB ₂ , DMSO, etanol, hloroform, metanol, metanol <i>HPLC grade</i> Stadardna jedinjenja: acetilsalicilna kiselina (aspirin), ametoflavon, bajkalin, bajkalein, celekoksib, daidzein, epigalokatehin galat, epikatehin, galna kiselina, genistein, hesperetin, hinska kiselina, hlorogenska kiselina, indometacin, kafena kiselina, katalpol, (+)-katehin, kemferol, kemferol-3- <i>O</i> -glukozid, krizoeriol, kvercetin dihidrat, kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid, kvercitrin, matairezol, naringenin, <i>p</i> -kumarinska kiselina, rezveratrol, rutin hidrat, sekoizolaricirezol, sinapinska kiselina, siringinska kiselina, skopoletin, <i>trans</i> cimetna kiselina, vanilinska kiselina, umbeliferon, 2,5-dihidorksibenzoeva kiselina, 3,4-dimetoksicimetna kiselina, 4-hidroksi benzoeva kiselina
Thermo Fisher, SAD	Prajmeri za mPGES-1, m-PGES-2 i TXAS

U radu su korišćeni sledeći instrumenti:

- Autoklav (VX-75, Systec)
- Biološki bezbednosni kabinet (Herasafe KS 12, Thermo Scientific)
- Centrifuga sa hlađenjem (3 – 30 K, Sigma)
- CO₂ inkubator (Forma 3111, Thermo Scientific)
- Fluorometar (Qubit[®] Fluorometar)
- Invertni mikroskop (DFC290HD, Leica Microsystems)
- Rotacioni vakuum uparivač (Helidolph)
- Spektrofotometar (Multiskan Spectrum v1.2, Thermo Scientific)
- Tečni hromatograf serije Agilent Technologies 1200 Series sa DAD detektorom, kuplovan sa Agilent Technologies 6410A Triple-Quad tandemskim masenim detektorom sa elektrosprej jonskim izvorom (ESI), za kontrolu instrumenata i analizu podataka korišćen je softver MassHunter ver. B.06.00. (Agilent Technologies)
- Tečni hromatograf visoke rezolucije sa UV/VIS detektorom (Agilent Technologies 1100 Series)
- Temperirana mućkalica za eppendorf tube (Eppendorf Thermo Mixer)
- Termosajkler (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems)
- Termosajkler sa fluorescentnim detektorom (Mx3000P QPCR System, Agilent Technologies)
- Zamrzivač za duboko zamrzavanje (CryoCubeF570, Eppendorf)
- Druga laboratorijska oprema: mikropipete, vorteks, ultrazvučno kupatilo i sl.

5.2. Priprema ispitivanih uzoraka

Cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije je bilo ispitivanje anti-inflamatorne aktivnosti (u smislu potencijala inhibicije produkcije PGE₂ i TXA₂) ekstrakata koji su bogati izvori polifenolnih jedinjenja, kao i standardnih polifenola za koje je, na osnovu hemijske analize, potvrđeno da predstavljaju dominantna polifenolna jedinjenja u ispitivanim uzorcima. Nakon optimizacije eksperimentalnih uslova, *in vitro* model sistem su predstavljali U937 monociti ili makrofage u kojima je inflamacija izazivana LPS-om, a praćena je produkcija PGE₂ i TXA₂, kao i ekspresija mRNK enzima uključenih u njihovu sintezu (cPLA₂ α , COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2, cPGES i TXAS). Razvijena metoda je korišćena i za ispitivanje aktivnosti nekoliko sintetskih jedinjenja.

Ispitivani uzorci su bili: metanolni i vodeni ekstrakti suvih listova šest vrsta bokvica (*Plantago* L.), sedamnaest *Merlot* vina, 20 polifenolnih jedinjenja, 1 triterpenska kiselina, 1 iridoid, 4 sintetska jedinjenja (trifluorometilovani derivati β -laktama, β -aminoestra i 2-imidazolina) i 4 standardna inhibitora COX-1/2 enzima.

5.2.1. Priprema ekstrakata odabranih vrsta roda *Plantago* L. (bokvica)

Biljni materijal vrsta roda *Plantago* L. (bokvica) sakupljen je tokom leta 2015. godine na teritoriji Srbije i Crne Gore, a jedino je vrsta *Plantago holesteum* Scop. prikupljena 2017. godine na području Bosne i Hercegovine. U sakupljanju biljnog materijal su učestvovali dr Goran Anačkov, dr Boris Radak, dr Bojana Bokić, dr Ivana Beara, mast. Ivana Nemeš i mast. Tatjana Majkić, a determinaciju je izvršila mast. Milica Rat. Biljni materijal je deponovan u Herbarijumu Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu (BUNS). U Tabeli 5.2. prikazani su brojevi vaučera i osnovni podaci o lokalitetu i datumu sakupljanja uzoraka ispitivanih vrsta roda *Plantago*.

Tabela 5.2. Podaci o broju vaučera, lokalitetu i datumu sakupljanja uzoraka ispitivanih vrsta roda *Plantago*

Vrsta	Broj vaučera	Lokalitet	Datum
<i>Plantago altissima</i> L. 1762	2-1435	Kej, Novi Sad, Srbija	31.07.2015.
<i>Plantago argentea</i> Chaix 1785	2-1432	Vrh Prutaš, Durmitor, Crna Gora	05.08.2015.
<i>Plantago holesteum</i> Scop.	2-1437	Korita, Bosna i Hercegovina	03.06.2017.
<i>Plantago lanceolata</i> L. 1753	2-1436	Kej, Novi Sad, Srbija	31.07.2015.
<i>Plantago major</i> L. 1753	2-1434	Avijatičarsko naselje, Novi Sad, Srbija	07.08.2015.
<i>Plantago media</i> L. 1753	2-1433	Mlinski potok, put ka Zminjem jezeru, Durmitor, Crna Gora	02.08.2015.

5.2.1.1. Priprema metanolnih ekstrakata

Priprema metanolnih ekstrakata lišća svih navedenih vrsta urađena je po istoj proceduri. Biljni materijal je ostavljen oko dva meseca u tamnoj, dobro provetrenoj

prostoriji. Usitnjeni suvi listovi preliveni su 80% metanolom (10.0 mL metanola / g suvog ostatka) i macerirani tokom 2 sata na sobnoj temperaturi uz mešanje. Nakon ceđenja preko Büchner-ovog levka, biljni materijal je ponovo preliven istom količinom 80% MeOH i maceriran tokom 2 sata uz mešanje. Postupak je ponovljen još dva puta. Nakon toga, ekstrakti su spojeni i upareni na rotacionom vakuum uparivaču, na temperaturi nižoj od 45 °C i osušeni do suva u eksikatoru. Suvi ostatak sirovog ekstrakta rastvoren je u toploj destilovanoj vodi (10.0 mL destilovane vode / g suvog ostatka). U cilju uklanjanja nepolarnih komponenti, ovaj rastvor je ispran petrol-etrom (frakcija 40-60 °C) do potpunog obezbojavanja petrol-etarskog sloja, a zatim ponovo uparen na rotacionom vakuum uparivaču i osušen u eksikatoru. Suvi ostatak je zatim rastvoren u destilovanoj vodi i napravljen je osnovni rastvor koncentracije 300 mg/mL. Pre ispitivanja biološke aktivnosti, svi uzorci su profiltrirani kroz sterilne PES filtere 22.0 µm. U *Tabeli 5.3.* prikazani su odgovarajući prinosi prečišćenih ekstrakata.

Tabela 5.3. Prinosi metanolnih ekstrakata ispitivanih vrsta roda Plantago

Vrsta	Oznaka u radu	Masa biljnog materijala (g)	Masa ekstrakta (g)	Prinos (%)
<i>P. altissima</i>	PALM	6.160	1.833	29.75
<i>P. argentea</i>	PARM	30.13	7.445	24.71
<i>P. holesteum.</i>	PHOM	6.640	1.228	18.49
<i>P. lanceolata</i>	PLAM	6.640	1.974	29.73
<i>P. major</i>	PMAM	9.810	2.578	26.28
<i>P. media</i>	PMEM	19.83	5.020	25.32

5.2.1.2. Priprema vodenih ekstrakata (infuza)

Priprema vodenih ekstrakata listova bokvica urađena je po uobičajenoj proceduri pripreme čaja. Usitnjen suv biljni materijal je preliven ključalom destilovanom vodom (100 mL na 2.50 g biljnog materijala) i maceriran 10 minuta na sobnoj temperaturi uz mešanje. Nakon ceđenja preko Büchner-ovog levka, uparavanja na rotacionom vakuum uparivaču i sušenja u eksikatoru, suvi ostatak je rastvoren u destilovanoj vodi i napravljen je osnovni rastvor koncentracije 300 mg/mL. Pre ispitivanja biološke aktivnosti, svi uzorci su profiltrirani kroz sterilne PES filtere 22.0 µm. Prinosi vodenih ekstrakata prikazani su u *Tabeli 5.4.*

Tabela 5.4. Prinosi vodenih ekstrakata ispitivanih vrsta roda Plantago

Vrsta	Oznaka u radu	Masa biljnog materijala (g)	Masa ekstrakta (g)	Prinos (%)
<i>P. altissima</i>	PALV	2.500	0.998	39.91
<i>P. argentea</i>	PARV	5.000	1.747	34.94
<i>P. holesteum.</i>	PHOV	2.500	0.431	17.26
<i>P. lanceolata</i>	PLAV	2.500	1.021	40.86
<i>P. major</i>	PMAV	2.500	0.991	39.63
<i>P. media</i>	PMEV	2.560	1.243	48.57

5.2.2. Priprema uzoraka *Merlot* vina

U radu su korišćeni uzorci *Merlot* vina koji su u periodu od februara do oktobra 2017. godine bili komercijalno dostupni u Novom Sadu. Ispitivani su uzorci *Merlot* vina sa područja Vojvodine, kao i iz pet evropskih država (Francuske, Italije, Makedonije, Slovenije i Španije), a u *Tabeli 5.5.* prikazani su osnovni podaci o ispitivanim uzorcima.

Priprema svih uzoraka urađena je po istoj proceduri. Vino je upareno na rotacionom vakuum uparivaču, a zatim osušeno do suva u eksikatoru. Prilikom uparavanja, temperatura vodenog kupatila je bila niža od 45 °C, kako ne bi došlo do degradacije termolabilnih komponenti uzorka. Suvi ostatak vina (*Tabela 5.5.*) rastvoren je u dimetil-sulfoksidu (DMSO) do koncentracije od 300 mg/mL. Svi uzorci su čuvani na -20 °C do korišćenja.

Tabela 5.5. Podaci o uzorcima vina

Uzorak vina	Oznaka	Berba/ godina proizvodnje	Proizvođač/Poreklo	Suvi ostatak (mg/mL vina)	Sadržaj alkohola (%)
Patrijaršijsko Merlo Vino	M1	2014/2015	Patrijašijsko dobro, Sremski Karlovci, Srbija	35.59	14.5
Mačkov Podrum <i>Merlot</i>	M2	2015/2016	Mačkov Podrum, Irig, Srbija	32.87	13.5
Deurić <i>Merlot</i>	M3	2015/2016	Deurić, Mala Remeta, Salaš 24, Srbija	32.88	12.0
DiMerlot DiBonis	M4	2008/2016	DiBonis, Subotica, Srbija	38.22	14.0
Vina Adžić San Trifone <i>Merlot</i>	M5	2011/2013	Vina Adžić, Temerin (Čortanovci), Srbija	29.55	13.4
Vinoprodukt <i>Merlot</i>	M6	2014/2016	Vinoprodukt, Subotica (Čoka), Srbija	29.82	12.0
Vinarija Mrdanin <i>Merlot</i>	M7	2013/2015	Vinarija Mrdanin, Sremski Karlovci, Srbija	30.87	13.0
Šukac <i>Merlot</i>	M8	2015/2016	Podrum Šukac, Sremska Kamenica, Srbija	31.73	12.5
Vinarija Došen <i>Merlot</i>	M9	2015/2016	Vinarija Došen, Sremski Karlovci, Srbija	27.74	12.0
Vinarija Veranda Bečar	M10	2012/2013	Vinarija Veranda, Hopovo, Srbija	37.11	14.5
Podrum Petrović <i>Merlot</i>	M11	2014/2015	Podrum Petrović, Sremski Karlovci, Srbija	31.51	12.5
Šijački <i>Merlot</i>	M12	2012/2016	Vinarija Šijački, Banoštor, Srbija	41.12	13.2
Grand Sud <i>Merlot</i>	MFR	2016/2017	Les Grands, Petersbach, Francuska	38.92	13.0
La Cacciatora <i>Merlot</i> Veneto	MIT		Missaglia, Veneto, Italija	29.14	11.5
Tikveš <i>Merlot</i>	MMA	2015/2016	Vinarska vizba Tikveš, Skoplje, Makedonija	34.91	14.5
Goriška Brda <i>Merlot</i>	MSL	2012/2014	Vinska klet Goriška Brda, Dobrovo, Slovenija	29.39	13.0
Don Luciano <i>Merlot</i> La Mancha	MSP	2014/2015	Garcia Carrion La Mancha S.A. Diamel, Ciudad Real, Španija	38.51	12.5

5.3. Određivanje hemijskog sastava ispitivanih uzoraka

5.3.1. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola i tanina

Sadržaj ukupnih polifenola i tanina određen je po prethodno opisanoj spektrofotometrijskoj metodi koja se zasniva na osobini polifenola da u reakciji sa Folin-Ciocalteu-ovim (FC) reagensom (smeša Na_2WO_4 , Na_2MoO_4 , HCl , H_3PO_4 i LiSO_4) grade obojeni kompleks (Singleton i sar., 1999; Beara i sar., 2009, Majkić i sar., 2019). Nakon određivanja sadržaja ukupnih polifenola, tanini su istaloženi dodatkom polivinilpolipirolidona (PVPP), a u supernatantu je određen sadržaj preostalih ukupnih polifenola. Sadržaj tanina u uzorcima predstavlja razliku sadržaja ukupnih polifenola pre i posle taloženja tanina (Rakić i sar., 2004).

Reagensi:

100 mmol/L FC reagens; 75.0 g/L Na_2CO_3 ; 1.00 mg/mL galna kiselina; 0.50 mg/mL katehin; 100 mmol/L natrijum-citratni pufer (pH = 3); polivinilpolipirolidon (PVPP).

Uzorci - početne koncentracije:

Merlot vina

M1–M12, MFR, MIT, MMA, MSL, MSP: 3.00, 1.50 i 0.75 mg/mL;

Eksrakti bokvica

PALM, PALV, PARM, PLAM: 1.25, 0.63 i 0.31 mg/mL;

PARV: 1.71, 0.86 i 0.43 mg/mL;

PHOM, PMEV, PMEM: 0.63, 0.31 i 0.16 mg/mL;

PHOV: 1.00, 0.50 i 0.25 mg/mL;

PLAV, PMAV, PMAM: 2.00, 1.00 i 0.50 mg/mL.

Postupak:

U cilju određivanja sadržaja ukupnih polifenolnih jedinjenja, osnovni rastvori uzoraka vina i ekstrakata bokvica su razblaženi odgovarajućim rastvaračem do navedenih početnih koncentracija. Galna kiselina i katehin su korišćeni za konstruisanje kalibracione krive u opsegu koncentracija od 0.63 do 80.0 $\mu\text{g/mL}$. Tanini su istaloženi dodatkom 50.0 mg PVPP i 500 μL natrijum-citratnog pufera (100 mmol/L, pH=3) na 500 μL ekstrakta. Smeša je vorteksirana, inkubirana 15 minuta na 4 °C, ponovo vorteksirana i centrifugirana (15 min, 2000 g, RT), a zatim je u supernatantu određen sadržaj preostalih polifenola. Sve radne probe rađene su u tri ponavljanja.

Trideset μL svake koncentracije ekstrakta ili standardnog rastvora dodato je u 150 μL 100 mmol/L FC reagensu, inkubirano 10 minuta i pomešano sa 120 μL Na_2CO_3 (7.5%). U slepu probu je umesto ispitivanih uzoraka dodat odgovarajući rastvarač (voda za bokvice, DMSO za vina), dok je u korekciji FC reagens zamenjen vodom. Dva sata nakon dodatka Na_2CO_3 apsorbancija pripremljenih rastvora je merena spektrofotometrijski (760 nm).

Na osnovu očitanih apsorbancija, izračunate su apsorbancije (A) za svaki ispitani uzorak po sledećoj formuli:

$$A = (A_{\text{sr}} - A_{\text{kor}}) - (A_{\text{sp}} - A_{\text{korsp}})$$

A_{sr} - apsorbancija srednje vrednosti radnih proba

A_{sp} - apsorbancija slepe probe

A_{kor} - apsorbancija korekcije

A_{korsp} - apsorbancija korekcije slepe probe

Korišćenjem kalibracionih kriva (funkcija apsorbancije u zavisnosti od koncentracije) galne kiseline i katehina izračunat je ukupan sadržaj polifenolnih jedinjenja pre i posle taloženja tanina.

Sadržaj ukupnih polifenola izražen je kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija (mikrogram-ekvivalenata galne kiseline po miligramu suvog ekstrakta i/ili miligram-ekvivalenata galne kiseline koje sadrži jedan litar vina, $\mu\text{g GKE/ mg s.e.}$ ili mg GKE/ L).

Sadržaj tanina u uzorcima izražen je kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija (mikrogram - ekvivalenata katehina po miligramu suvog ekstrakta i/ili miligram ekvivalenata katehina koje sadrži jedan litar vina, $\mu\text{g KE/ mg s.e.}$ ili mg KE/ L), a odgovarajuće kalibracione krive i apsorbancije su prikazane u *Prilogu (Pogavlja 9.3.1. i 9.4.1.)*.

5.3.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida određen je spektrofotometrijski, merenjem apsorbancije metalokompleksa koji grade flavonoidi i flavonglikozidi sa metalima. Naročito je značajan Al-kompleks, jer se Al^{3+} vezuje za ukupne flavonoide gradeći žuto obojeni kompleks čija se apsorbancija određuje (Chang i sar., 2002; Beara i sar., 2009, Majkić i sar., 2019).

Reagensi:

0.75 mol/L AlCl_3 ; 1.00 mol/L CH_3COONa ; 1.00 mg/mL kvercetin

Uzorci - početne koncentracije:

Merlot vina

M1, M9: 30.0, 15.0 i 3.75 mg/mL;

M2, M5, M6, M11, M12, MFR, MIT, MMA, SL, MSP: 30.0, 15.0 i 7.50 mg/mL;

M3: 30.0, 7.50 i 3.75 mg/mL;

M4, M7, M8, M10: 15.0, 7.50 i 3.75 mg/mL;

Ekstrakti bokvica

PALM: 7.14, 5.00 i 3.57 mg/mL;

PALV, PARV, PMEV: 5.00, 3.75 i 2.50 mg/mL;

PARM: 2.70, 2.40 i 1.44 mg/mL;

PHOM: 1.00, 0.63 i 0.50 mg/mL;

PHOV: 2.50, 2.00 i 1.25 mg/mL;

PLAM: 10.0, 7.14 i 5.00 mg/mL;

PLAV: 5.00, 2.50 i 1.88 mg/mL;

PMAM: 7.14, 3.57 i 2.50 mg/mL;

PMAV: 10.0, 5.00 i 3.75 mg/mL;

PMEM: 3.75, 2.50 i 1.88 mg/mL.

Postupak:

Napravljena su razblaženja kvercetina za standardnu krivu u rasponu koncentracije od 0.63 do 80.0 µg/mL, a osnovni rastvor ekstrakata razblažen je do navedenih početnih koncentracija.

Trideset µL ekstrakta ili standardnog rastvora pomešano je sa 90 µL metanola, 6 µL 0.75 mol/L AlCl₃ (supstituisanog destilovanom vodom u korekciji), 6 µL 1 mol/L natrijum-acetata i 170 µL destilovane vode. Pripremljeni rastvori su inkubirani 30 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim je merena njihova apsorpcija na 415 nm. Sve radne probe rađene su u tri ponavljanja.

Na osnovu očitanih apsorpcija, izračunate su apsorpcije (A) za svaki ispitani uzorak po sledećoj formuli:

$$A = (A_{sr} - A_{kor}) - (A_{sp} - A_{korsp})$$

A_{sr} - apsorpcija srednje vrednosti radnih proba

A_{sp} - apsorpcija slepe probe

A_{kor} - apsorpcija korekcije

A_{korsp} - apsorpcija korekcije slepe probe

Sadržaj flavonoida je izračunat na osnovu kalibracione krive (funkcija apsorpcije u zavisnosti od koncentracije) standardnog rastvora kvercetina. Rezultat je izražen kao srednja vrednost tri merenja ± standardna devijacija (mikrogram-ekvivalenta kvercetina po miligramu suvog ekstrakta i/ili miligram-ekvivalenta kvercetina koje sadrži jedan litar vina, µg KvE/ mg s.e. ili mg KvE/ mL), a odgovarajuće kalibracione krive i apsorpcije su prikazane u *Prilogu (Pogavlja 9.3.1. i 9.4.1.)*.

5.3.3. Određivanje sadržaja ukupnih monomernih antocijana

Sadržaj ukupnih monomernih antocijana određen je primenom pH diferencijalne metode, koja se zasniva na osobini antocijana da reverzibilno menjaju strukturu i boju u zavisnosti od pH sredine (Lee i sar., 2005). Pri pH 1 dominira crveno obojeni oksonijum oblik, sa maksimumom apsorpcije na 520 nm, dok se na pH 4.5 antocijani nalaze u bezbojnoj hemiketalnoj formi. Koncentracija monomernih antocijana proporcionalna je razlici između apsorpcije očitane pri pH 1 i pri pH 4.5 na 520 nm. Rezultati su izraženi u ekvivalentima malvidin-3-O-glukozida, dominantnog antocijana u vinu (Majkić i sar., 2019).

Reagensi

Pufer pH=1 (25.0 mmol/L KCl); pufer pH=4.5 (400 mmol/L CH₃COONa).

Uzorci - početne koncentracije:

Merlot vina

M1: 140 mg/mL;

M2–M12: 150 mg/mL;

MFR, MIT, MMA, MSL, MSP: 300 mg/mL.

Postupak:

Osnovni rastvori ekstrakata vina razblaženi su do početnih koncentracija od 150 mg/mL, a M2 do koncentracije od 140 mg/mL. Petnaest μL uzorka pomešano je sa 285 μL pufera pH 4.5 (400 mmol/L natrijum acetata) ili pH 1 (25.0 mmol/L kalijum hlorida), a nakon 40 minuta apsorbancija je izmerena na 520 i 700 nm.

Iz razlike apsorbancija dobijenih na 520 i 700 nm, pri različitim pH vrednostima izračunate su apsorbancije (A) za svaki ispitani ekstrakt:

$$A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH 1}} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH 4.5}}$$

Koncentracija ukupnih monomernih antocijana (C_{uk}) u ekstraktu izračunata je prema formuli:

$$C_{\text{uk}} [\text{mg/L}] = (A \times M \times F \times 1000) / (\epsilon \times l)$$

A = apsorbancija izračunata prema formuli

M = 493.2 g/mol (molekulska masa malvidin-3-O-glukozida)

F = 20.0 (faktor razblaženja ekstrakta)

ϵ = 28000 $\text{cm}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{L}$ (molarni apsorpcioni koeficijent malvidin-3-O-glukozida)

l = 0.80 cm (put svetlosti kroz ćeliju mikroploče)

Rezultat je izražen kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija (mikrogram-ekvivalenta malvidin-3-O-glikozida po miligramu suvog ekstrakta i miligram-ekvivalenta malvidin-3-O-glikozida koje sadrži jedan litar vina, $\mu\text{g ME}/\text{mg s.e.}$ ili $\text{mg ME}/\text{L}$ vina), a odgovarajuće apsorbancije su prikazane u *Prilogu (Poglavlje 9.4.1.)*.

5.3.4. Određivanje hemijskog sastava ekstrakata odabranih vrsta bokvica primenom HPLC-MS/MS i HPLC- DAD tehnika

5.3.4.1. HPLC-MS/MS detekcija odabranih jedinjenja u ekstraktima bokvica

Odabrane polifenolne komponente u ispitivanim uzorcima kvantifikovane su primenom HPLC-MS/MS tehnike po modifikovanoj metodi Orčića i saradnika (2014). Korišćen je *Agilent Technologies 1200 Series Rapid Resolution* tečni hromatograf, kuplovan sa G6410A QqQ MS-MS detektorom sa elektrosprej jonskim izvorom (ESI), kontrolisan *MassHunter* ver. B.06.00. softverskim programom (*Agilent Technologies*).

Pre analize, svi uzorci ekstrakata bokvica su razblaženi 50% metanolom do koncentracije 20.0, 10.0 mg/mL ili 2.00 mg/mL i profiltrirani kroz membranski filter (0.45 μm , RC). Za hromatografsko razdvajanje korišćena je reverzo-fazna kolona *Zorbax Eclipse XDB-C18 RR* (4.6 mm \times 50 mm, veličina pora 1.8 μm , *Agilent Technologies*) pri temperaturi od 50 °C. Binarna mobilna faza sastojala se od 0.05% mravlje kiseline (A) i metanola (B), a protok je iznosio 0.50 mL/min. Primenjen je gradijentni mod, koji je podrazumevao sledeći odnos faza: 0 minuta 30% B; 12 minuta 70% B; 18 minuta 100% B; 24 minuta 100% B, sa vremenom rekvilibracije od 6 minuta. Injektovana zapremina svih uzoraka bila je 5 μL . ESI parametri bili su: gas za sušenje (N_2) temperature 350 °C, protok 9 L/min, pritisak gasa nebulajzera 30 psi, napon na kapilari 4 kV, negativan polaritet. Jedinjenja su praćena u dinamičkom MRM (*multiple reactions monitoring*) modu. Ostali optimizovani parametri dati su u *Tabeli 5.6*. Metoda obuhvata praćenje 44

polifenolna jedinjenja i hinske kiseline kao prekursora polifenola, koji čine osnovni miksa (Orčić i sar., 2014), sa dodatkom 2 jedinjenja (ursolna kiselina i izoskopoletin), koja su snimljena pri istim uslovima. Kalibracioni standardi koncentracija 1.50 ng/mL do 25.0 µg/mL pripremljeni su sekvencijalnim razblaživanjem (1:1) osnovnog miksa koncentracije 100 µg/mL, i dodatnih jedinjenja, smešom metanol-voda (1:1). Određivanje sadržaja odabranih komponenti u ispitivanim uzorcima urađeno je na osnovu standardne kalibracione krive (funkcija površine pika u zavisnosti od koncentracije standarda), snimljene iz serije razblaženja miksa standarda (Majkić i sar., 2020). Odstupanja od srednje vrednosti rezultata (standardna devijacija) je izračunata po metodi Orčić i sar., 2014. Očitane površine pikova, kalibracione krive i hromatogrami su prikazani u *Poglavlju 9.3.2. u Prilogu*.

Tabela 5.6. HPLC-MS/MS parametri za kvantifikaciju odabranih jedinjenja u ekstraktima ispitivanih vrsta roda *Plantago*

Jedinjenje	Retenciono vreme (min)	Napon fragmentora	Jon prekursor (m/z)	Jon proizvod (m/z)	Koliziona energija
2,5-Dihidroksibenzoeva kiselina	2.70	100	153	109	9
3,4-Dimetoksicimetna kiselina	7.63	110	207	103	7
Amentoflavon	13.01	220	537	375	35
Apigenin	10.85	130	269	117	25
Apigenin-7-O-glukozid	7.10	135	431	268	41
Apiin	6.95	250	563	269	36
Bajkalein	9.85	165	269	269	0
Bajkalin	8.33	140	445	269	22
Cimetna kiselina	9.44	100	147	103	5
Daidzein	8.54	145	253	208	31
Epigalokatehin galat	2.66	165	457	169	16
Epikatehin	3.05	150	289	245	10
Eskuletin	3.12	105	177	133	15
Ferulna kiselina	5.18	90	193	134	11
Galna kiselina	1.38	90	169	125	10
Genistein	9.86	145	269	133	32
Hinska kiselina	1.08	150	191	85	20
Hiperozid	6.25	200	463	300	30
Hlorogenska kiselina	2.45	100	353	191	10
Izoramnetin	11.16	160	315	300	21
Izokopoletin	4.56	120	191	176	5
Kafena kiselina	3.30	100	179	135	10
Katehin	2.06	150	289	245	10
Kemferol	11.9	130	285	285	0
Kemferol-3-O-glukozid	7.41	190	447	284	30
Krizoeriol	11.1	125	299	284	20
Kvercetin	9.07	130	301	151	15
Kvercetin-3-O-glukozid	6.22	210	463	300	30
Kvercitrin	7.33	190	447	300	27
Luteolin	9.56	135	285	133	25
Luteolin-7-O-glukozid	6.01	230	447	285	30
Matairezinol	8.92	130	357	122	24
Miricetin	7.32	150	317	179	20
Naringenin	9.38	130	271	151	16
<i>o</i> -Kumarinska kiselina	6.84	100	163	119	5
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	2.93	80	137	93	10
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	4.63	90	163	119	9
Protokatehinska kiselina	1.98	105	153	109	9
Rutin	6.16	135	609	300	42
Sekoizolaricirezinol	7.40	130	361	165	26
Sinapinska kiselina	5.25	100	223	193	17
Siringinska kiselina	3.73	90	197	182	7
Skopoletin	4.82	80	191	176	8
Umbeliferon	4.80	120	161	133	19
Ursolna kiselina	19.32	300	455	455	12
Vanilinska kiselina	3.48	100	167	108	15
Viteksin	5.46	200	431	311	22

5.3.4.2. HPLC-DAD detekcija odabranih jedinjenja u ekstraktima bokvica

Aukubin, verbaskozid i katalpol u ispitivanim uzorcima kvantifikovani su primenom tačne hromatografije visokih performansi sa detektorom sa nizom dioda (HPLC-DAD). Korišćen je *Agilent Technologies 1200 Series Rapid Resolution* tačni hromatograf, koji se sastoji od binarne pumpe, automatizovanog injektora i DAD detektora. Pre analize, ekstrakti bokvica su razblaženi do koncentracije od 20.0 mg/mL, odnosno 4.00 mg/mL, 5% acetonitrilom i filtrirani kroz membranski filter (0.45 µm, RC). Injektovano je 5 µL svih uzoraka, a za hromatografsko razdvajanje korišćena je *Zorbax Extend-C18* kolona (4.6 × 250 mm, veličina pora: 5 µm, *Agilent Technologies*) termostatirana na 30 °C. Binarna mobilna faza sastojala se od 0.1% mravlje kiseline (A) i acetonitrila (B), a protok je iznosio 0.5 mL/min. Primenjen je gradijentni mod, koji je podrazumevao sledeći odnos faza: 0 minuta 5% B; 10 minuta 5% B; 20 minuta 40% B; 30 minuta 100% B; 35 minuta 100% B, sa vremenom reekvilibracije od 5 minuta. Detekcija eluiranih jedinjenja izvedena je na 210 nm, a retenciona vremena su prikazana u *Tabeli 5.7*. Korišćene su kalibracione krive u opsegu koncentracija od 41.7 µg/mL do 666.7 µg/mL za akteozid, i 83.3 µg/mL do 666.7 µg/mL za aukubin i katalpol, a koeficijenti korelacije su iznosili 0.992, 0.959 i 0.986, redom (Majkić i sar., 2020). Očitane površine pikova, kalibracione krive i hromatogrami su prikazani u *Poglavlju 9.3.2*. u *Prilogu*.

Tabela 5.7. Retenciona vremena odabranih jedinjenja analiziranih u uzorcima ispitivanih vrsta bokvica

Jedinjenje	Retenciono vreme (min)
Akteozid	22.63
Aukubin	18.42
Katalpol	11.08

5.3.5. Određivanje polifenolnog profila *Merlot* vina primenom HPLC-UV/VIS tehnike

Kvantitativno određivanje polifenolnog profila uzoraka vina urađeno je na Institutu za javno zdravlje Vojvodine u saradnji sa dr Ljiljom Torović, redovnim profesorom Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu.

Pre analize, uzorci vina su uzeti direktno iz originalnih ambalaža (flaša) i filtrirani su kroz membranski filter (0.45 µm; Sartorius, SAD). Analize su izvedene pomoću tačnog hromatografa serije *Agilent 1100* (SAD), koji se sastoji od kvaternerne gradijentne pumpe, autosamplera sa sistemom za ubrizgavanje (10–200 µL), grejača kolone, UV-VIS i fluorescentnih detektora i softverskog paketa. Za sve analize korišćena je reverzno-fazna kolona *Poroshell 120 EC-C18* (4.6 × 100, veličina pora 2.7 µm; *Agilent*). Kvantifikacija odabranih jedinjenja izvršena je primenom eksterne kalibracione krive. Svi rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD tri različite analize.

5.3.5.1. Određivanje sadržaja odabranih polifenolih jedinjenja u Merlot vinima

Za hromatografsko razdvajanje injektovano je 5 μ L uzorka i korišćena je reverzofazna kolona pri temperaturi od 25 °C. Binarna mobilna faza sastojala se od 0.1% sirćetne kiseline (A) i 0.1% sirćetne kiseline u acetonitrilu (B), a protok je iznosio 1 mL/min. Primenjen je gradijentni mod, koji je podrazumevao sledeći odnos faza: 0 minuta, 8% B; 3.25 minuta, 10% B; 8 minuta, 12% B; 15 minuta, 25% B; 15.8 minuta, 30% B; 24 minuta, 50% B; 25–27 minuta, 100% B; 28–34 minuta, 8% B. Detekcija je izvršena UV/VIS detektorom na sledećim talasnim dužinama (nm): 225 (vanilinska kiselina, benzoeva kiselina), 280 (galna kiselina, 4-hidroksi benzoeva kiselina, katehin, siringinska kiselina, *trans*-cimetna kiselina, hesperetin, naringenin), 305 (*p*-kumarinska kiselina), 330 (hlorogenska kiselina, kafena kiselina), 360 (rutin, kvercetin, kaempferol). Jedino je za rezveratrol primenjena detekcija fluorescencijom (eksitacija 330 nm, emisija 374 nm). Kalibracione krive su konstruisane koristeći površine pikova koje odgovaraju koncentracijama analita u opsegu od 0.50 do 25.0 mg/L i pokazale su odličnu linearnost, sa koeficijentima korelacije preko 0.998 za sva jedinjenja, osim benzoeve kiseline (0.99). Osetljivost određivanja postignuta je povećanjem injektovane zapremine uzoraka, do pet puta više od standardne smeše, omogućavajući tako granice kvantifikacije od 0.1 mg/L, posebno važne za manje zastupljena jedinjenja. Granica detekcije je testirana i verifikovana na nivou od 0.05 mg/L sa potrebnim $S/N \geq 3$. Ponovljivost je utvrđena trostrukom analizom uzoraka vina i izražena kao standardno odstupanje rezultata (Miljić i sar., 2017; Majkić i sar., 2019).

5.3.5.2. Određivanje sadržaja odabranih antocijana u Merlot vinima

Antocijani malvidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-glukozid, delphinidin-3-*O*-glukozid, petunidin-3-*O*-glukozid i peonidin-3-*O*-glukozid su rastvoreni u metanolu zakišljenom sa 1% HCl. Smeša svih pet antocijanina je razblažena početnom mobilnom fazom i korišćena za konstruisanje kalibracionih krivih u opsegu koncentracija od 100 μ g/L do 100 mg/L. Linarnost svih pet odgovarajućih krivih potvrđena je koeficijentima korelacije višim od 0.998. Injektovana zapremina vina iznosila je 100 μ L. Za hromatografsko razdvajanje korišćena je reverzno fazna kolona zagrejana na 40 °C. Protok je podešen na 0.8 mL/min, a vreme analize 14 minuta. Primenjen je gradijentni mod eluiranja, smešama voda:mravlja kiselina:acetonitril (A - 87:10:3, B - 40:10:50). Antocijanini su detektovani na 518 nm prema metodi Kompendijuma međunarodnih metoda analize – OIV (2013) i opisanoj u Beara i sar. (2017). Najniža tačka kalibracije (0.10 mg/L) postavljena je kao praktična granica kvantifikacije na osnovu potvrđenog odnosa $S/N \geq 10$, dok je granica detekcije ($S/N \geq 3$) verifikovana na nivou od 0.05 mg/L (Beara i sar., 2017; Majkić i sar., 2019).

5.4. Uticaj odabranih uzoraka na produkciju PGE₂ i TXA₂

5.4.1. Gajenje U937 ćelija (monocita)

Humani leukemijski U937 monociti su gajeni u RPMI-1640 medijumu (medijum za ćelijske kulture *Roswell Park Memorial Institute*), koji je sadržao 10% (v/v) fetalnog goveđeg seruma (FBS, *fetal bovine serum*), 2.05 mmol/L L-glutamina, 25.0 mmol/L HEPES (4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etansulfonska kiselina), 100 U/mL penicilina, 0.10 mg/mL streptomicina i 0.25 µg/mL amfotericina B, na 37 °C, u atmosferi visoke vlažnosti sa 5% CO₂. Ćelije su gajene u suspenziji, a gustina je održavana između 2×10⁵ i 2×10⁶ ćelija/mL. Za eksperimente su korišćene ćelije do 15 pasaža, pri čemu nije zabeležena promena morfoloških karakteristika.

5.4.2. Transformacija U937 monocita u makrofage

Za diferencijaciju u makrofage, 2×10⁶ monocita u 2 mL kompletnog medijuma sa dodatkom 100 nmol/L PMA je zasejano u otvore mikrotitar ploče sa šest otvora (6-well mikrotitar ploča). Posle 72 sata, medijum iz supernatanta je zamenjen svežim medijumom bez seruma i ćelije su korišćene za dalje testove.

5.4.3. Ispitivanje citotoksičnosti

Citotoksičnost je određena brojanjem ćelija primenom tripan plavog. Tripan plavo (*trypan blue*) je anjonska boja koja se koristi za selektivno bojenje ćelija. Selektivnost je posledica nemogućnosti boje da prođe kroz ćelijsku membranu, osim ako ona nije oštećena. Rezultat je da vijabilne ćelije ovu boju ne usvajaju i ne boje se, dok se nevijabilne ćelije boje u plavo.

Ćelije su brojane u hemocitometru (Neubauer-ova komora), posmatranom pod mikroskopom. Pri ispitivanju citotoksičnosti pratio se odnos broja vijabilnih i nevijabilnih ćelija u radnim probama i kontroli, i na osnovu toga je određena citotoksičnost ispitivanih uzoraka.

Reagensi:

U937 ćelije; medijum RPMI-1640 sa dodatkom 2.05 mmol/L L-glutamina i 25.0 mmol/L HEPES-a; 0.40% rastvor tripan plavog u PBS-u.

Uzorci - početne koncentracije:

Merlot vina

M1–M12, MFR, MIT, MMA, MSL, MSP: 300 mg/mL;

Ekstrakti bokvica

PALM, PALV, PARM, PARV, PHOM, PHOV, PLAM, PLAV, PMAM, PMAV, PMEM, PMEV: 200 mg/mL;

Standardi

Fenolne kiseline

Galna, kafena, *p*-kumarinska, protokatehinska, siringinska i vanilinska kiselina: 200 mmol/L;

Hlorogenska kiselina: 50.0 mmol/L;

Flavonodi

Apigenin: 200, 100, 50.0, 30.0, 20.0, 10.0 i 5.00 mmol/L;

Apigenin-7-*O*-glukozid: 100 mmol/L;

Apigenin-7-*O*-glukuronid: 50.0 mmol/L;

Epikatehin: 200 i 100 mmol/L;

Katehin: 100 mmol/L;

Kvercetin: 200, 100, 60.0, 50.0, 10.0 i 5.00 mmol/L;

Luteolin: 100, 50.0, 30.0, 20.0, 10.0 i 5.00 mmol/L;

Luteolin-7-*O*-glukozid: 50.0 mmol/L;

Luteolin-7-*O*-glukuronid: 50.0 mmol/L;

Miricetin: 100, 30.0, 20.0 i 10.0 mmol/L;

Rutin: 200 i 100 mmol/L;

Dihidrohalkon

Floretin: 50.0, 20.0 i 2.00 mmol/L;

Stilbeni

Rezveratrol: 100 i 50.0 mmol/L;

Pterostilben: 50.0; 20.0 i 2.00 mmol/L;

Iridoid

Aukubin: 50.0 i 5.00 mmol/L;

Triterpenska kiselina

Ursolna kiselina: 50.0, 10.0 i 5.00 mmol/L;

Standardni inhibitori COX-1/2 enzima

Aspirin: 200, 100 i 50.0 mmol/L;

Celekoksib: 100, 50.0, 20.0 i 10.0 mmol/L;

Indometacin: 100, 50.0, 30.0, 20.0 i 10.0 mmol/L;

SC-560: 600 μ mol/L i 60.0 μ mol/L;

Sintetska jedinjenja

1-benzil-3-metil-4-(trifluorometil)azetid-2-on (*trans*-1): 200, 100, 50.0, 25.0 i 12.5 mmol/L.

1-benzil-3-fenil-4-(trifluorometil)azetid-2-on (*trans*-2): 200 mmol/L.

metil 3-(benzilamino)-4,4,4-trifluoro-2-fenilbutanoat (**3**): 200, 100, 50.0, 25.0 i 12.5 mmol/L

metil *trans*-1-benzil-5-(trifluorometil)-4,5-dihidro-1*H*-imidazol-4-karboksilat (*trans*-4): 200 i 100 mmol/L.

Postupak:

U svaki otvor *6-well* mikrotitar ploče dodato je 2×10^6 ćelija u 2 mL RPMI-1640 medijuma bez FBS-a. Nakon 1 sata inkubacije (37 °C, atmosfera visoke vlažnosti, 5% CO₂) dodat je 1 μ L ispitivanog uzorka vina ili standarda, odnosno 5 μ L ekstrakta bokvica odgovarajuće koncentracije. U kontrolu je dodata ista zapremina (1 μ L ili 5 μ L)

rastvarača u kom je rastvoren uzorak. Sve probe su rađene u tri ponavljanja. Nakon inkubacije tokom 22 sata (37 °C, atmosfera visoke vlažnosti, 5% CO₂), određena je vijabilnost ćelija.

Pomešano je 50 µl ćelijske suspenzije i 50 µl boje tripan plavo, i nakon 5 minuta inkubacije (sobna temperatura), suspenzija je naneta na hemocitometar. U četiri različita kvadrata izbrojane su obojene (nevijabilne) i neobojene (vijabilne) ćelije. Broj ćelija u 1 mL suspenzije je izračunat prema sledećoj formuli:

$$\text{broj ćelija / mL} = \text{srednja vrednost broja ćelija u kvadratima / zapremina kvadrata u kom su izbrojane ćelije (mL)}^*$$

$$*\text{zapremina kvadrata u kom su izbrojane ćelije (mL)} = 100 \text{ nL} = 1 * 10^{-4} \text{ mL}$$

Procenat vijabilnih ćelija u uzorku je izračunat po formuli:

$$\% \text{ vijabilnih ćelija} = (\text{broj živih ćelija / ukupan broj ćelija}) \times 100\%$$

Rezultat je izražen kao procenat živih ćelija u radnim probama u odnosu na kontrolu. Ukoliko je rezultat veći od 95% smatrano je da ispitivani uzorak nije ispoljio citotoksično delovanje. Tabele u kojima su prikazani rezultati nalaze se u *Prilogu (Poglavlje 9.2.)*.

5.4.4. Određivanje uticaja na produkciju PGE₂ i TXA₂

Određivanje aktivnosti ispitivanih ekstrakata i standardnih jedinjenja urađeno je po modifikovanim metodama Wong i sar. (1997), Penglis i sar. (2000) i Jiang i sar. (2003a). Metoda je zasnovana na određivanju sposobnosti inhibicije produkcije metabolita ciklooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline, PGE₂ i TXA₂, u humanim leukemijskim monocitima i makrofagama, pri sledećim uslovima:

- a) u nestimulisanim monocitima
- b) u LPS-stimulisanim monocitima (inflamacija izazvana dodatkom LPS; Majkić i sar., 2020)
- c) u LPS-stimulisanim makrofagama (inflamacija izazvana dodatkom LPS; Majkić i sar., 2019; Beara i sar., 2020)

U svim slučajevima, egzogena arahidonska kiselina je predstavljala supstrat enzima, a koncentracija PGE₂ i TXA₂ u uzorcima je određena primenom HPLC-MS/MS tehnike.

5.4.4.1. Uticaj na produkciju PGE₂ i TXA₂ u nestimulisanim monocitima

U monocitima nije zabeležena ekspresija COX-2, pa se smatra da proizvedeni PGE₂ i TXA₂ nastaju u kaskadi koja započinje delovanjem COX-1, nakon dodatka arahidonske kiseline. Zbog toga ovaj sistem može da se koristi za ispitivanje uticaja datih jedinjenja i ekstrakta na produkciju PGE₂ i TXA₂ tokom homeostaze.

Reagensi:

U937 ćelijska linija; 20.0 mmol/L arahidonska kiselina (rastvorena u DMSO); 1.00% HCOOH; 1.00 mg/mL PGB₂ (rastvoren u DMSO - osnovni rastvor); 30.0 µg/mL PGB₂ (razblažen osnovni rastvor PGB₂ u RPMI-1640 medijumu bez FBS-a).

Uzorci – početna koncentracija:

Ekstrakti bokvica

PALM, PALV, PARM, PARV, PHOM, PHOV, PLAM, PLAV, PMAM, PMAV, PMEM, PMEV: 200 mg/mL

Standardi

Fenolne kiseline

Galna, hlorogenska i kafena kiselina: 50.0 i 5.00 mmol/L;

Flavonodi

Apigenin, luteolin, miricetin: 5.00 mmol/L;

Apigenin-7-*O*-glukozid, apigenin-7-*O*-glukuronid, epikatehin, luteolin-7-*O*-glukozid, luteolin-7-*O*-glukuronid, katehin.: 50.0 i 5.00 mmol/L;

Stilben

Rezveratrol: 50.0 i 5.00 mmol/L;

Iridoid

Aukubin: 5.00 mmol/L;

Triterpenska kiselina

Ursolna kiselina: 5.00 mmol/L;

Standardni inhibitori COX-1/2 enzima

Aspirin: 5.00 mmol/L;

Celekoksib: 5.00 mmol/L;

Indometacin: 5.00 mmol/L;

SC-560: 60 μ mol/L.

Postupak:

U svaki otvor 6-*well* mikrotitar ploče dodato je 2×10^6 monocita resuspendovanih u 2 mL RPMI-1640 medijuma bez seruma. Nakon 1 sata inkubacije dodat je 1 μ L ispitivanih standardnih jedinjenja ili 5 μ L ekstakata bokvica navedenih koncentracija i uzorci su inkubirani tokom 2 sata. Reakcija je inicirana dodatkom 1 μ L arahidonske kiseline (20 mmol/L), a nakon 10 minuta stopirana dodatkom 400 μ L hladne 1% mravlje kiseline. U kontrolama su ispitivana jedinjenja i ekstrakti zamenjeni odgovarajućim rastvaračima, a u korekciji kontrole je i arahidonska kiselina zamenjena 1 μ L DMSO. Nakon zastavljanja reakcije dodat je interni standard PGB₂ (10.0 μ L; 30.0 μ g/mL). Sve probe, kontrole i korekcije kontrole su rađene u tri ili u šest ponavljanja. Tokom svih inkubacija, mikrotitar ploče sa reakcionim smešama su bile u inkubatoru (37 °C, atmosfera visoke vlažnosti, 5% CO₂). Nastali proizvodi PGE₂ i TXA₂, kao i interni standard PGB₂, izolovani su po proceduri opisanoj u *Poglavlju 5.4.4.4*.

5.4.4.2. Uticaj na produkciju PGE₂ i TXA₂ u LPS-stimulisanim monocitima

Nakon dodatka LPS-a, stimulusa inflamatornih procesa, u monocitima dolazi do ekspresije COX-2, što je praćeno povećanom produkcijom PGE₂ i TXA₂ (Demasi i sar., 2000). Za nastajanje proizvoda ciklooksigenaznog puta u ovom slučaju odgovorne su i COX-1 i COX-2. Ovaj model sistem može da se koristi za ispitivanje sposobnosti uzoraka da inhibiraju produkciju PGE₂ i TXA₂ u monocitima, odnosno u procesima

inflamacije gde su stimulisani monociti u krvi (monociti tokom početnih faza inflamacije, tj. nisu transformisani u makrofage u tkivu gde se odvija inflamatorni proces; Majkić i sar., 2020).

Reagensi:

U937 ćelijska linija; 1.00 mg/mL LPS (rastvoren u RPMI-1640 medijumu bez FBS-a); 20.0 mmol/L arahidonska kiselina (u DMSO); 1.00% HCOOH; 1.00 mg/mL PGB₂ (rastvoren u DMSO- osnovni rastvor); 30.0 µg/mL PGB₂ (razblažen osnovni rastvor PGB₂ u RPMI-1640 medijumu bez FBS-a).

Uzorci:

Ekstrakti bokvica

PALM, PALV, PARM, PARV, PHOM, PHOV, PLAM, PLAV, PMAM, PMAV, PMEM, PMEV: 200 mg/mL;

Standardi

Fenolne kiseline

Galna, hlorogenska i kafena kiselina: 5.00 mmol/L;

Flavonodi

Apigenin, apigenin-7-*O*-glukozid, epikatehin, luteolin, luteolin-7-*O*-glukozid, katehin, miricetin: 5.00 mmol/L;

Dihidrohalkon

Floretin: 2.00 mmol/L

Stilbeni

Rezveratrol: 5.00 mmol/L;

Pterostilben: 2.00 mmol/L;

Iridoid

Aukubin: 5.00 mmol/L;

Triterpenska kiselina

Ursolna kiselina: 5.00 mmol/L;

Standardni inhibitori COX-1/2 enzima

Aspirin: 5.00 mmol/L;

Celekoksib: 5.00 mmol/L;

Indometacin: 5.00 mmol/L;

SC-560: 60.0 µmol/L.

Postupak:

U svaki otvor 6-*well* mikrotitar ploče dodato je 2×10^6 monocita resuspendovanih u 2 mL RPMI-1640 medijuma bez seruma. Posle 1 sata inkubacije, dodat je 1 µL ispitivanih standardnih jedinjenja ili 5 µL ekstakata bokvica navedenih koncentracija. Nakon naredna 2 sata inkubacije, u ćelijama je izazvana inflamacija dodatkom LPS (1 µL, 1.00 mg/mL). Nakon 20 sati, dodat je 1 µL arahidonske kiseline (20.0 mmol/L), a posle 45 minuta reakcija je stopirana dodatkom 400 µL hladne 1% mravlje kiseline. U kontrolama su ispitivana jedinjenja i ekstrakti zamenjeni odgovarajućim rastvaračima, a u korekciji kontrole je arahidonska kiselina zamenjena 1 µL DMSO. Nakon zastavljanja reakcije dodat je interni standard PGB₂ (10.0 µL; 30.0 µg/mL). Sve probe, kontrole i korekcije

kontrole su rađene u tri ili u šest ponavljanja. Tokom svih inkubacija, mikrotitar ploče sa reakcionim smešama su bile u inkubatoru (37 °C, atmosfera visoke vlažnosti, 5% CO₂). Nastali proizvodi PGE₂ i TXA₂ i interni standard, PGB₂, ekstrahovani su po proceduri opisanoj u Poglavlju 5.4.4.4.

5.4.4.3. Uticaj na produkciju PGE₂ i TXA₂ u LPS-stimulisanim makrofagama

Imuni odgovor organizma na spoljni patogen uključuje transport monocita do mesta inflamacije gde se oni transformišu u makrofage i aktivno učestvuju u inflamatornom odgovoru. U eksperimentalnim uslovima, monociti su diferencirani do makrofaga delovanjem PMA. U makrofagama dolazi do ekspresije COX-2, koja je dodatno snažno povećana dejstvom inflamatornih agenasa, kao što je npr. LPS i rezultuje povećanom produkcijom PGE₂ i TXA₂. Ključne faze nastajanja ovih proizvoda uključuju dominantno dejstvo COX-2, uz manji doprinos COX-1, a ovaj model sistem može da se koristi za ispitivanje sposobnosti uzoraka da inhibiraju inflamaciju tokom kasnijih faza inflamatornog odgovora, kada su monociti već transformisani u makrofage na mestima gde se ovi procesi inflamacije odvijaju (Majkić i sar., 2019; Beara i sar., 2020).

Reagensi:

U937 ćelijska linija - makrofage; 1.00 mg/mL LPS (rastvoren u RPMI-1640 medijumu bez FBS-a); 20.0 mmol/L arahidonska kiselina (rastvorena u DMSO); 1.00% HCOOH; 1.00 mg/mL PGB₂ (rastvoren u DMSO- osnovni rastvor); 30.0 µg/mL PGB₂ (razblažen osnovni rastvor PGB₂ u RPMI-1640 medijumu bez FBS-a).

Uzorci - početna koncentracija:

Merlot vina

M1–M12, MFR, MIT, MMA, MSL, MSP: 300 mg/mL;

Ekstrakti bokvica

PALM, PARM, PLAM, PMAM: 300 mg/mL;

Standardi

Fenolne kiseline

Galna, kafena, *p*-kumarinska, protokatehinska, siringinska i vanilinska: 50.0 mmol/L;

Flavonodi

Epikatehin, katehin, rutin: 50.0 mmol/L;

Stilbeni

Rezveratrol: 50.0 mmol/L;

Standardni inhibitori COX-1/2 enzima

Aspirin: 50.0 mmol/L;

Indometacin: 10.0 mmol/L;

Celecoksib: 10.0 mmol/L;

Sintetska jedinjenja:

1-benzil-3-metil-4-(trifluorometil)azetid-2-on (*trans*-**1**), 1-benzil-3-fenil-4-(trifluorometil)azetid-2-on (*trans*-**2**); metil *trans*-1-benzil-5-(trifluorometil)-4,5-dihidro-1*H*-imidazol-4-karboksilat (*trans*-**4**): 100.0 mmol/L; metil 3-(benzilamino)-4,4,4-trifluoro-2-fenilbutanoat (**3**): 50.0 mmol/L.

Postupak:

Makrofage (2×10^6 ćelija u 2 mL RPMI-1640 medijuma bez seruma, dobijene po postupku opisanom u *Poglavlju 5.4.2.*) su inkubirane sa ispitivanim uzorcima (1 μ L standardna jedinjenja, 1 μ L vina ili 3 μ L ekstrakata bokvica) tokom 2 sata, a zatim stimulisane dodatkom 1 μ L LPS (1.00 mg/mL) tokom 20 sati. Posle toga je dodat 1 μ L arahidonske kiseline (20.0 mmol/L) i ćelije su inkubirane narednih 45 minuta. Zakišeljavanje hladnom 1% mravljom kiselinom (400 μ L) snižava pH do pH 3, usled čega se reakcija zaustavlja. Kao interni standard korišćen je PGB₂ (10.0 μ L; 30.0 μ g/mL). U kontrole je umesto ispitivanih jedinjenja dodata ista zapremina odgovarajućih rastvarača, a u korekciju kontrole nije dodata arahidonska kiselina već DMSO. Svi uzorci i kontrola rađeni su u tri ili šest ponavljanja. Tokom svih inkubacija, mikrotitar ploče sa reakcionim smešama su bile u inkubatoru (37 °C, atmosfera visoke vlažnosti, 5% CO₂). Nastali proizvodi PGE₂ i TXA₂, kao i interni standard PGB₂, izolovani su po proceduri opisanoj u *Poglavlju 5.4.4.4.*

5.4.4.4. Ekstrakcija i kvantifikacija PGE₂ i TXA₂

Nakon zaustavljanja reakcije, nastali proizvodi PGE₂ i TXA₂, neizreagovala arahidonska kiselina, kao i interni standard PGB₂, izolovani su ekstrakcijom i kvantifikovali primenom HPLC-MS/MS tehnike po neznatno modifikovanim metodama Beara i saradnici (2010) i Lesjak i saradnici (2013).

Regensi:

Hloroform, metanol, sirćetna kiselina

Postupak:

Reakciona smeša je pomešana sa 3 mL smeše metanola i hloroforma (1:1), intenzivno mućkana tokom 15 minuta i centrifugirana (3500 g, 15 min, 4 °C). Nakon centrifugiranja, donji (organski) sloj je odvojen, na ostatak je dodato 3 mL hloroforma i ceo postupak je ponovljen. Spojeni organski slojevi su upareni na rotacionom vakuum uparivaču do suva. U cilju uklanjanja tragova hloroforma, u suvi ostatak je dodato 500 μ L metanola, uzorci su promućkani na vorteksu i ponovo upareni do suva. Zatim su finalni, suvi uzorci rastvoreni u 250 μ L metanola, profiltrani (0.45 μ M, PDVP) i analizirani primenom HPLC-MS/MS tehnike.

Primenom HPLC-MS/MS tehnike u uzorcima su kvantifikovani PGE₂, TXB₂, kao stabilni metabolit TXA₂, i interni standard, PGB₂. Upotrebom internog standarda izbegnuto je korišćenje eksternih kalibracionih kriva za svaki metabolit posebno i istovremeno kompenzovan uticaj matriksa.

Hromatografsko razdvajanje izvedeno je na reverzno-faznoj koloni *Zorbax SB-C18* (30 mm \times 2.1 mm \times 3.5 μ m, *Agilent Technologies*) pri temperaturi od 65 °C. Binarna mobilna faza sastojala se od 0.1% sirćetne kiseline (A) i metanola (B), a protok je iznosio 0.20 mL/min. Primenjivao se gradijentni mod, sledećeg odnosa faza: 0.0 minuta 65% B, 10.0 min 100% B, 17.5 minuta 100% B, sa vremenom reekvilibracije od 15.0 minuta. Injektovana zapremina svih uzoraka bila je 5 μ L. ESI parametri su bili: gas za

sušenje (N₂) temperature 350 °C, protok 10.0 L/min, pritisak gasa nebulajzera 50 psi i napon na kapilari 4 kV, dok su ostali optimizovani parametri prikazani su u *Tabeli 5.8*. Kvantifikacija jedinjenja urađena je u negativnom MRM modu.

Tabela 5.8. Parametri za kvantifikaciju PGB₂, PGE₂ i TXB₂

Jedinjenje	Mod	Polaritet jona	Jonska vrsta	Jon prekursor (m/z)	Jon proizvod (m/z)	Koliziona energija (V)	Napon fragmentora (V)
PGB ₂	MRM	NI	[M-H] ⁻	333	315	13	120
PGE ₂	MRM	NI	[M-H] ⁻	351	271	15	120
TXB ₂	MRM	NI	[M-H] ⁻	369	169	15	120

Uticaj ispitivanih ekstrakata bokvica, uzoraka vina i standardnih jedinjenja na produkciju PGE₂ i TXA₂, izražen je kao odnos količine produkovanog PGE₂ ili TXA₂ u radnim probama i u kontroli (%). Ovaj odnos izračunat je na osnovu odnosa površine pikova PGE₂ i internog standarda PGB₂ u radnim probama i površine pikova PGE₂ i PGB₂ u kontroli, očitanih sa odgovarajućih hromatograma dobijenih HPLC-MS/MS analizom:

$$\text{PGE}_2(\%) = \frac{(\text{površina pika PGE}_2 / \text{površina pika PGB}_2)_{\text{proba}}}{(\text{površina pika PGE}_2 / \text{površina pika PGB}_2)_{\text{kontrola}}} \times 100$$

$$\text{TXA}_2(\%) = \frac{(\text{površina pika TXB}_2 / \text{površina pika PGB}_2)_{\text{proba}}}{(\text{površina pika TXB}_2 / \text{površina pika PGB}_2)_{\text{kontrola}}} \times 100$$

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri određene vrednosti ± standardna devijacija (%). Tabele sa rezultatima prikazane su u *Prilogu (Poglavlje 9.3.3., 9.4.2., 9.5. i 9.6.)*

5.4.5. Određivanje uticaja na ekspresiju mRNK odabranih enzima ciklooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline u U937 monocitima i makrofagama primenom RT-qPCR

U optimizovanom *in vitro* sistemu, koji je korišćen za određivanje sposobnosti inhibicije produkcije PGE₂ i TXA₂, analiziran je uticaj ispitivanih uzoraka *Merlot* vina i ekstrakata bokvica, kao i odabranih jedinjenja na ekspresiju mRNK odabranih enzima ciklooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline u U937 monocitima (Majkić i sar., 2020) i makrofagama (Beara i sar., 2020). Kao model sistem korišćeni su monociti i makrofage u kojima je inflamacija izazvana dodatkom LPS-a. U svim uzorcima određena je ekspresija mRNK enzima uključenih u produkciju PGE₂ i TXA₂: cPLA₂α, COX-1/2, mPGES-1/2, cPGES i TXAS primenom tehnike RT-qPCR.

Ribonukleinske kiseline (RNK) su ekstrahovana smešom *TRIzol*[®]/hloroform i istaložene izopropil alkoholom, a zatim je koncentracija RNK određena fluorometrijski, primenom komercijalno dostupnog kompleta (*Qubit RNA BR Assay Kit*). Nakon tretmana deoksiribonukleazom (*Dnase I (RNase-free) Kit*), na osnovu mRNK sekvence sintetisana je komplementarna DNK (cDNA) upotrebom komercijalno dostupnog kompleta (*High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit*). Za kvantitativnu analizu ekspresije korišćen je komercijalno dostupan komplet (*Power SYBR Green PCR Master Mix*) uz upotrebu odgovarajućih humanih prajmera za cPLA₂α (*PLA2G4A*), COX-1/2 (*PTGS1/PTGS2*),

mPGES-1 (PTGES), *mPGES-2 (PTGES2)*, *cPGES (PTGES3)* i *TXAS(TBXAS1)* gene. Ekspresija mRNK je normalizovana na referentnu mRNK gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (*GAPDH*) i predstavljene su Δ Ct. Za svaki uzorak, izračunata je srednja vrednost Δ Ct. Relativna ekspresija gena normalizovana je u odnosu na kontrolu (100%)

5.4.5.1. *Tretman LPS-stimulisanih U937 monocita*

Reagensi:

U937 ćelijska linija; 1.00 mg/mL LPS (rastvoren u RPMI-1640 medijumu bez FBS-a); *TRIzol*[®].

Uzorci – početna koncentracija:

Ekstrakti bokvica

PALM, PALV, PARM, PARV, PHOM, PHOV, PLAM, PLAV, PMAM, PMAV, PMEM, PMEV: 200 mg/mL;

Standardi

Fenolne kiseline

Galna, hlorogenska i kafena kiselina: 5.00 mmol/L;

Flavonodi

Apigenin, apigenin-7-*O*-glukozid, apigenin-7-*O*-glukuronid, epikatehin, luteolin, luteolin-7-*O*-glukozid, luteolin-7-*O*-glukuronid, katehin, miricetin: 5.00 mmol/L;

Dihidrohalkon

Floretin: 2.00 mmol/L;

Stilbeni

Rezveratrol: 5.00 mmol/L;

Pterostilben: 2.00 mmol/L;

Iridoid

Aukubin: 5.00 mmol/L

Triterpenska kiselina

Ursolna kiselina: 5.00 mmol/L.

Postupak:

U svaki otvor 6-*well* mikrotitar ploče dodato je 2×10^6 monocita resuspendovanih u 2 mL RPMI-1640 medijuma bez seruma. Nakon 1 sata inkubacije, dodat je 1 μ L ispitivanih standardnih jedinjenja ili 5 μ L ekstakata bokvica navedenih koncentracija. U kontrole je umesto uzoraka dodata odgovarajuća zapremina rastvarača. Nakon 2 sata inkubacije, inflamacija je izazvana dodatkom 1 μ L LPS (1 mg/mL) i ćelije su inkubirane narednih 20 sati. Zatim su ćelije odvojene od dna suda (strugane tokom 2 minuta nastavcima za pipetu), suspenzije su prebačene u endorf tube i centrifugirane (12000 g, 20 min, 4 °C). Nakon odvajanja supernatanta, na talog je dodato 600 μ L *TRIzol*-a. Tokom svih inkubacija, mikrotitar ploče sa reakcionim smešama su bile u inkubatoru (37 °C, atmosfera visoke vlažnosti, 5% CO₂). Sve radne probe i kontrole su testirane u tri ponavljanja. Uzorci su čuvani na -80 °C do daljih eksperimenata.

5.4.5.2. *Tretman LPS-stimuliranih U937 makrofaga*

Reagensi:

U937 ćelijska linija - makrofage; 1,00 mg/mL LPS (rastvoren u RPMI-1640 medijumu bez FBS-a); *TRIzol*[®].

Uzorci – početna koncentracija:

Merlot vina

M4 i M10: 300 mg/mL;

Sintetska jedinjenja

1-benzil-3-metil-4-(trifluorometil)azetidin-2-on (*trans-1*), 1-benzil-3-fenil-4-(trifluorometil)azetidin-2-on (*trans-2*); metil *trans-1*-benzil-5-(trifluorometil)-4,5-dihidro-1*H*-imidazol-4-karboksilat (*trans-4*): 50.0 mmol/L;
metil 3-(benzilamino)-4,4,4-trifluoro-2-fenilbutanoat (**3**): 25.0 mmol/L.

Postupak:

Makrofage (2×10^6 ćelija u 2 mL RPMI-1640 medijuma bez seruma, dobijene po postupku opisanom u *Poglavlju 5.4.2.*) su inkubirane sa 1 μ L uzoraka tokom 2 sata, a zatim stimulirane dodatkom 1 μ L LPS tokom 20 sati. U kontrole je umesto ispitivanih uzoraka dodata ista zapremina DMSO, a u korekciju kontrole nije dodat LPS. Svi uzorci i kontrola rađeni su u tri ili šest ponavljanja. Zatim su ćelije odvojene od dna suda (strugane tokom 3 minuta nastavcima za pipetu), suspenzije su prebačene u ependorf tube i centrifugirane (12000 g, 20 min, 4 °C). Nakon odvajanja supernatanta, na talog je dodato 600 μ L *TRIzol-a*. Tokom svih inkubacija, mikrotitar ploče sa reakcionim smešama su bile u inkubatoru (37 °C, atmosfera visoke vlažnosti, 5% CO₂). Radne probe i kontrole su rađene u tri ponavljanja. Svi uzorci su čuvani na -80 °C do daljih eksperimenata.

5.4.5.3. *Ekstrakcija ribonukleinskih kiselina (RNK)*

Ribonukleinske kiseline (RNK) su ekstrahovane smešom *TRIzol*[®]/hlороform i istaložene izopropil alkoholom (Chomczynski i Sacchi, 1987). *TRIzol*[®] sadrži fenol i gvanidinium-tiocijanat (GITC), zahvaljujući kojima se narušava kompleks RNK i proteina. Nakon homogenizacije uzoraka, dodaje se hlороform, a zatim se vrši ekstrakcija (mućkanje) i centrifugiranje. Nakon centrifugiranja uočavaju se tri sloja: gornji vodeni sloj koji sadrži RNK, srednji sloj denaturisanih proteina i fenolni, donji, sloj u kom se nalaze lipofilne ćelijske komponente. Po odvajanju vodenog sloja, izolovane RNK se talože dodatkom izopropanola, ispiraju, a zatim rastvaraju u DEPC vodi (dietil pirokarbonatom tretiranoj vodi) i čuvaju na -80 °C.

Reagensi:

TRIzol[®]; hlороform; izopropanol; 75.0% etanol; DEPC voda.

Postupak:

Nakon odmrzavanja, uzorci (talog ćelija u 600 μ L *TRIzol-a*) su homogenizovani pomoću igle (25G \times 5/8'') i šprica. Na homogenizovane uzorke je dodato još 400 μ L

TRIzol-a, uzorci su promućkani i inkubirani tokom 5 minuta na sobnoj temperaturi. Dodato je 200 μL hloroforma i uzorci su intenzivno mućkani tokom 30 sekundi. Zatim su inkubirani 2–3 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugirani (12000 g, 20 min, 4 °C). Nakon centrifugiranja, stavljeni su na led (4 °C) i vodeni sloj (koji sadrži RNK) je odvojen u nove ependorf tube i pomešan sa 500 μL izopropanola. Nakon kratkog mućkanja, uzorci su inkubirani tokom 10 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugirani (12000 g, 20 min, 4 °C). Dobijen je talog RNK koji je ispran dodatkom 1.2 mL 75% etanola (vorteksiranje i centrifugiranje 8600 g, 5 min, 4 °C). Supernatant je odbačen, a talog prečišćene RNK je osušen tokom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim je na talog (u zavisnosti od količine) dodato između 30 i 50 μL DEPC vode i uzorci su inkubirani tokom 10 minuta na 58 °C. Nakon rastvaranja, izolovana RNK je čuvana na -80 °C do daljih eksperimenata.

5.4.5.4. Određivanje koncentracije RNK

Koncentracija RNK je određena fluorometrijski, primenom komercijalno dostupnog kompleta *Qubit RNA BR Assay Kit* i *Qubit*[®] fluorometra. Ovaj komplet sadrži reagense selektivne za RNK u odnosu na DNK i pogodan je za određivanje koncentracije RNK u uzorcima koji sadrže između 1.00 ng/ μL i 1.00 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ RNK.

Reagensi:

Qubit RNA BR Assay Kit (Q10211, Invitrogen) koji sadrži 200 \times koncentrovan *Qubit RNA BR reagens*, *Qubit RNA BR* pufer za razblaženja i dva standarda (koncentracije RNK 0 i 100 ng/ μL); DEPC voda.

Postupak (po uputstvu proizvođača):

Pripremljen je radni rastvor reagensa, za jedan uzorak je 1 μL *Qubit RNA BR* reagensa razblaženo sa 199 μL *Qubit RNA BR* pufera. Ukupna zapremina radnog rastvora je prilagođena broju uzoraka analiziranih tokom jednog dana.

Napravljena je kalibraciona kriva, čiju početnu i krajnju tačku predstavljaju standardi #1 (0 ng/ μL) i #2 (100 ng/ μL). Pomešano je 10 μL standarda i 190 μL sveže pripremljenog radnog rastvora, a sadržaj u *Qubit* tubama je promešan na vorteksu, kratko centrifugiran (*spin-down*) kako bi se uklonili mehurići, inkubiran 2 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim je koncentracija RNK očitana na fluorometru.

Koncentracija RNK u uzorcima je određena mešanjem 1 μL rastvora RNK nepoznate koncentracije i 199 μL radnog rastvora reagensa. Smeša u *Qubit* tubi je promešana na vorteksu, kratko centrifugirana (*spin-down*), inkubirana 2 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim je koncentracija RNK očitana na fluorometru. Ukoliko je koncentracija u uzorku bila veća od koncentracije standarda #2, uzorak je razblažen dodatkom DEPC vode. Ukoliko je koncentracija u uzorku bila previše niska, pomešano je 2 μL rastvora RNK nepoznate koncentracije i 198 μL sveže pripremljenog radnog rastvora reagensa za određivanje RNK i ponovljen je opisani postupak.

5.4.5.5. *Tretman deoksiribonukleazom (Dnase I) i sinteza komplementarne DNK (cDNK)*

Usled nestabilnosti RNK, neophodno je izolovanu mRNK prevesti u komplementarnu DNK (cDNK) koja može dalje da se umnožava u lančanoj reakciji polimeraze. Prevođenje mRNK u cDNK se odvija delovanjem enzima reverzne transkriptaze. Međutim, pre reakcije reverzne transkripcije, neophodno je da se uklone potencijalno zaostale sekvence DNK, što se postiže tretmanom sa enzimom deoksiribonukleaza (DNasa).

Tretman deoksiribonukleazom

Deoksiribonukleaza je enzim koji hidrolizuje fosfodiesterne veze u molekulu DNK, pri čemu su joj neophodni kofaktori, Mg^{2+} i Ca^{2+} . Za tretman deoksiribonukleazom korišćen je komercijalni komplet *DNase I (RNase-free) Kit*.

Reagensi:

DNase I (RNase-free) Kit (AM2222, Ambion) komplet koji sadrži enzim *Dnase I* (2 U/ μ L) i 10 \times koncentrovani pufer za enzim *DNase I* (100 mmol/L Tris pufer pH 7.5; 25.0 mmol/L $MgCl_2$ i 5.00 mmol/L $CaCl_2$); DEPC voda.

Postupak (po uputstvu proizvođača):

Nakon određivanja koncentracije RNK u uzorcima, izračunato je koja zapremina rastvora izolovane RNK sadrži 1 μ g RNK. U ependorf tube za PCR otpipetirane su zapremine uzorka kompletne RNK koja sadrži 1 μ g RNK, 1 μ L 10 \times koncentrovanog DNase pufera, 0.5 μ L enzima deoksiribonukleaze (1 U) i DEPC H_2O do zapremine od 10 μ L (Tabela 5.9.). Uzorci su kratko centrifugirani (*spin-down*) kako tečnost ne bi zaostala na zidovima ependorf tuba i stavljeni u termosajkler. Podešen je program koji je obuhvatao dve faze: 30 minuta inkubacije na 37 °C tokom kojih se odvija enzimska hidroliza i 10 minuta inkubacije na 70 °C, tokom kojih se enzim inaktivira i reakcija zaustavlja. Nakon završetka reakcije, odmah je nastavljena sinteza cDNK.

Tabela 5.9. Zapremine reagenasa za reakciju tretmana deoksiribonukleazom

Uzorak	Koncentracija RNK (μ g/ μ L)	Zapremina 1 μ g RNK (μ L)	Zapremina DNase I pufera (μ L)	Zapremina DNase I enzima (μ L)	Zapremina DEPC H_2O * (μ L)
	A	B			
1	A	B= A/1000	1.00	0.50	8.50 - B

* zapremina koju je potrebno dodati da ukupna zapremina reakcione smeše iznosi 10 μ L

Sinteza cDNK

Nakon tretmana deoksiribonukleazom (Dnase I), na osnovu mRNK sekvence sintetisana je cDNA upotrebom kompleta *Highcapacity cDNA Reverse Transcription Kit*. Reverzna transkriptaza (RT) je posebna vrsta DNK polimeraze, koja na osnovu postojeće mRNK sintetiše komplementaran DNK lanac.

Reagensi:

Highcapacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368813, Applied Biosystems) koji sadrži enzim reverznu transkriptazu (*MultiScribe™ Reverse Transcriptase*, 50 U/ μ L), 10 \times koncentrovani RT pufer, 25 \times koncentrovani dNTP miks (100 mmol/L), 10 \times koncentrovane RT prajmere; DEPC voda.

Postupak (po uputstvu proizvođača):

Na osnovu broja uzoraka pripremljena je smeša svih komponenti iz kompleta. Za jedan uzorak, 2 \times koncentrovana smeša za RT reakciju sadrži: 2 μ L 10 \times RT pufera, 0.8 μ L 25 \times dNTP smeše (sadrži nukleotide koji su neophodni za sintezu cDNK), 2 μ L 10 \times RT prajmera, 1 μ L enzima RT i 4.2 μ L DEPC vode. Zatim je u svaku od ependorf tuba, koja sadrži po 10 μ L rastvora RNK tretiranog deoksiribonukleazom, pipetirano po 10 μ L ove smeše. Nakon kratkog mućkanja i centrifugiranja (*spin down*), uzorci su stavljani u termosajkler i podešen je program koji je obuhvatao sledeće faze: 10 minuta inkubacije na 25 °C, 120 minuta na 37 °C (tokom ovog vremena odigrava se reakcija reverzne transkripcije) i 5 minuta na 85 °C (tokom ovog perioda se enzim inaktivira i reakcija zaustavlja). Sintetisana cDNK je čuvana na -20 °C do izvođenja RT-qPCR.

5.4.5.6. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze (qPCR)

Kvantifikacija ekspresije mRNK enzima uključenih u produkciju PGE₂ i TXA₂ izvedena je primenom tehnike kvantitativne reakcije lančane polimeraze u stvarnom vremenu (RT-qPCR) uz korišćenje fluorescentne boje SYBR zelene (*SYBR green*). SYBR zelena se ugrađuje u dvostuki heliks DNK, formirajući fluorescentni kompleks, čija je fluorescencija merena na aparatu *Stratagene M \times 3005P*. Prisustvo ove boje omogućava praćenje povećanja koncentracije DNK u realnom vremenu. Sama boja veoma slabo fluorescira, ali kako se povećava koncentracija DNK, povećava se i fluorescencija, usled ugrađivanja boje u dvostruki heliks DNK.

Reagensi:

Briliant II SYBR Green QPCR Master Mix (600808, Applied Biosystems) koji sadrži 1.00 mmol/L referentne boje (*SYBR green*) i *Briliant II SYBR Green QPCR Master Mix* (sadrži nukleotide AGTC, *Sure Start Taq DNK* polimerazu, 2.50 mmol/L MgCl₂); humani prajmeri odgovarajući za analizirane gene (*Tabela 5.10.*); DEPC voda

Tabela 5.10. Sekvence korišćenih prajmera

	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
<i>GAPDH</i>	TGG TAT CGT GGA AGG ACT C	AGT AGA GGC AGG GAT GAT G
<i>cPLA2α (PLA2G4A)</i>	CAT CTC GTT GCT CTG TTT CCC	TGC TGC CGT TTC CAG TAC AT
<i>COX-1 (PTGS1)</i>	GAG CTC TGA GGG GCA GGA AA	AAC CCC AAC ACT CAC CAT GC
<i>COX-2 (PTGS2)</i>	CAG CAC TTC ACG CAT CAG TT	CGC AGT TTA CGC TGT CTA GC
<i>mPGES-1 (PTGES)</i>	TCT TAG CCC CTT GGA TTC CT	ATT CTT AGC CCG GGA TTC AG
<i>mPGES-2 (PTGES2)</i>	GGA GAA AGC TCG CAA CAA CT	TTC CCA CCA TAC ACT TGC TG
<i>cPGES (PTGES3)</i>	CAA GCA TAA AAG AAC GGA CAG ATC A	AAT CAT CAT CTG CTC CAT CTA CTT C
<i>TXAS (TBXAS1)</i>	CCT TCT CCT GGC TCA TTT A	TCG TCT CGG TTC TTA TTG G

Postupak (po uputstvu proizvođača):

qPCR je izveden u 96-well mikrotitar ploči sa konusnim dnom. Reakciona smeša za jedan uzorak sadržala je 4 μL prethodno sintetisane cDNA, 1 μL smeše specifičnih prajmera (*forward* i *reverse*, $c = 10000 \text{ mmol/L}$), 7.12 μL DEPC H₂O, 0.38 μL referentne boje i 12.5 μL 2× *Pover SYBR Green PCR Master Mix*-a. Negativne kontrole su umesto cDNK sadržale odgovarajuće zapremine DEPC vode.

Nakon dodatka svih reagenasa, izvršeno je kratko centrifugiranje, kako bi se sav sadržaj spustio na dno otvora u PCR mikrotitar ploči i izbegla pojava mehurica. Korišćen je program koji je obuhvatao sledeće faze: početna denaturacija (95 °C, 10 min, 1 ciklus); denaturacija / vezivanje prajmera / sinteza komplementarnog lanca (95 °C, 30 s / 55 °C, 1 min / 72 °C, 1 min; 50 ciklusa); kriva topljenja / hlađenje / kraj (95 °C, 1 min / 55 °C, 30 s / 95 °C, 30 s; 1 ciklus), kraj (4 °C). Fluorescencija je merena na 521 nm nakon završetka svakog ciklusa PCR-a.

Nakon očitavanja Ct (*cycle threshold*, broj ciklusa potreban da fluorescentni signal pređe prag), izvršeno je određivanje relativne ekspresije (Livak i Schmittgen, 2001):

$$R=2^{-\Delta Ct}$$

$$\Delta Ct = Ct(\text{enzim}) - Ct(\text{GAPDH})$$

R - relativna ekspresija

Ct(enzim) - Ct u uzorcima u koje su dodati prajmeri nvedeni u *Tabeli 5.10.*, za odgovarajuće enzime uključene u produkciju PGE₂ i TXA₂,
Ct(GAPDH) - Ct enzima gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze

Za svaki uzorak, izračunata je srednja vrednost ΔCt. Relativna ekspresija gena normalizovana je u odnosu na kontrolu (100%).

5.5. Obrada podataka

Za statističku obradu dobijenih podataka su korišćeni programi Statistica (StatSoft, Dell), verzija 12.2 i Microsoft Office Excel 2007. Kao mera centralne tendencije neke grupe korišćena je aritmetička sredina, a mera varijacije među podacima izražena je standardnom devijacijom (Microsoft Office Excel 2007). Statistička značajnost razlika određenih grupa je ispitivana analizom varijanse (ANOVA), praćenom post-hoc Tukey HSD testom, korišćenjem softvera Statistica. Statističke hipoteze su testirane na nivou statističke značajnosti od 0.05, odnosno statistički značajnim smatrale su se razlike na nivou značajnosti (pouzdanosti) $p \leq 0.05$.

U testovima u kojima je ispitivan modulatorni efekat na produkciju PGE₂ i TXA₂ statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu je određena primenom t testa za nezavisne uzorke nejednake varijanse.

Stepen zavisnosti pojava među uzorcima određivan je koeficijentom linearne korelacije, *Pearsonovim* koeficijentom (r). *Pearsonovi* koeficijenti mogu da imaju vrednost od -1 do 1, a što je apsolutna vrednost *Pearsonovog* koeficijenta bliža 1, može se zaključiti da postoji veća korelacija (pozitivna ili negativna) između analiziranih varijabli. Naime, smatra se da ukoliko je apsolutna vrednost r niža od 0.4 postoji slaba korelacija, vrednosti između 0.4 i 0.75 svedoče o umerenoj korelaciji. Dobru korelaciju karakterišu vrednosti između 0.75 i 0.85, dok vrednosti iznad 0.85 govore da je reč o odličnoj korelaciji

Analiza glavnih komponentata (*Principal Component Analysis*, PCA) primenjena na normalizovane rezultate, izvršena je korišćenjem softvera Statistica. Normalizovane vrednosti rezultata fitohemijskih ispitivanja izračunate su koristeći dobijene direktne vrednosti za svako pojedinačno kvantifikovano jedinjenje prema formuli:

$$y_{\text{inor}} = 100 [y_i - y_{\text{min}}] / [y_{\text{max}} - y_{\text{min}}]$$

y_{inor} - normalizovana vrednost u jednom uzorku

y_i -vrednost u uzorku

y_{min} -najmanja vrednost od svih analiziranih uzoraka

y_{max} -najveća vrednost od svih analiziranih uzoraka

Normalizovane vrednosti rezultata testova inhibicije produkcije metabolita arahidonske kiseline izračunate su prema navedenoj formuli za svaki test pojedinačno, pri čemu su korišćene recipročne vrednosti dobijenih vrednosti. Odgovarajuće kalibracione krive zavisnosti apsorbanacije od koncentracije galne kiseline, kvercetina ili katehina (sprektrofotometrijski testovi) i zavisnost površine pika od koncentracije standarda (rezultati HPLC-MS/MS i HPLC-DAD analiza) nacrtane su uz pomoć Origin softvera, verzija 8.0. Rezultati su predstavljeni tabelarno i grafički.

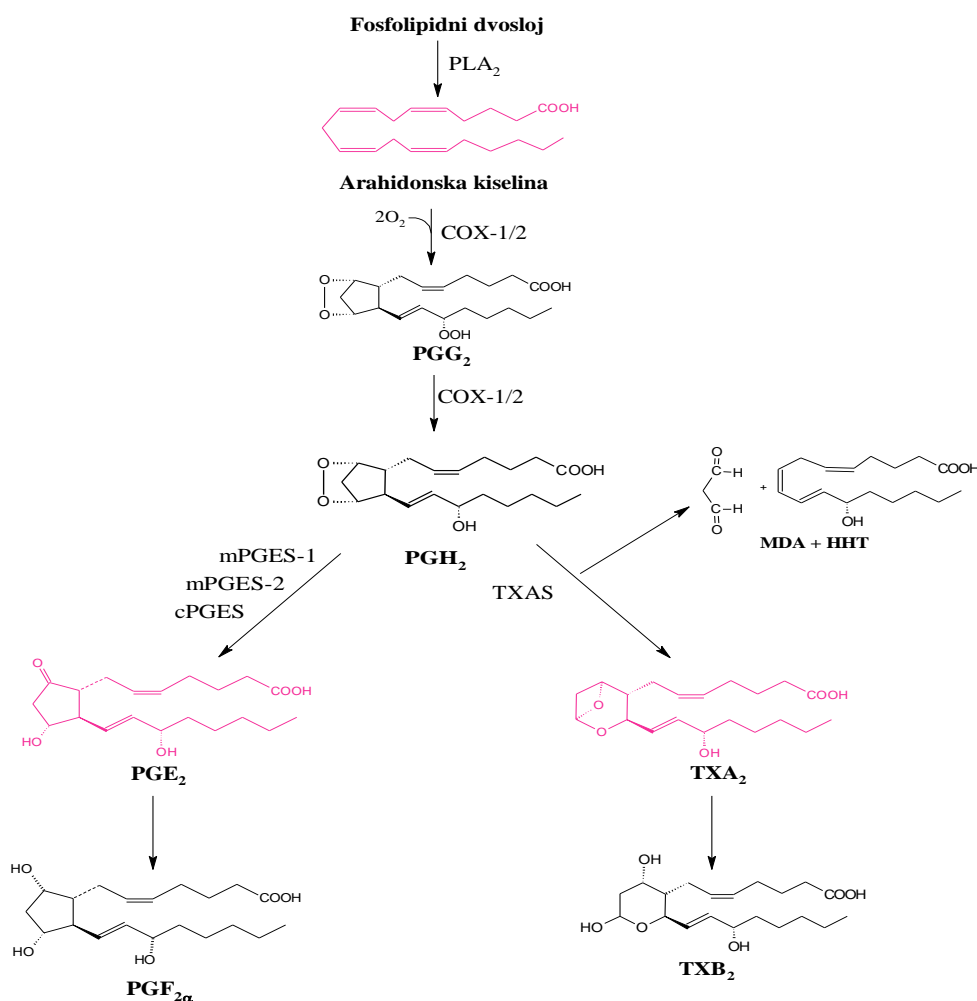
6. Rezultati i diskusija

U skladu sa trendovima u istraživanjima prirodnih proizvoda kao potencijalnih anti-inflamatornih agenasa, u okviru ove doktorske disertacije analiziran je potencijal odabranih polifenola, odnosno uzoraka vina i ekstrakata bokvica koji su bogat izvor polifenolnih jedinjenja, kao modulatora produkcije PGE_2 i TXA_2 u inflamatornim procesima. Dve glavne smernice ovih istraživanja čine:

1. *Mogućnost supresije inflamatornog procesa na nivou inhibicije produkcije PGE_2 i TXA_2*

PGE_2 je neophodan za pravilno funkcionisanje bubrega, reproduktivnog i gastrointestinalnog sistema. Nasuprot tome, PGE_2 je i jedan od najpoznatijih proinflamatornih medijatora koji je odgovoran za klasične znakove upale: otok, bol, crvenilo. Povećana produkcija PGE_2 doprinosi razvoju kancera, artritisa i kardiovaskularnih bolesti (detaljan prikaz mehanizma delovanja i biološke funkcije PGE_2 je dat u *Poglavlju 4.3.*).

Uopšteno, nivo produkcije i funkcija PGE_2 zavise od kompleksne mreže enzima uključenih u njegovu sintezu (*Slika 6.1.*) i degradaciju, kao i od prisustva čak četiri receptora preko kojih PGE_2 ispoljava svoje delovanje.



Slika 6.1. Šema produkcije PGE_2 i TXA_2

COX - ciklooksigenaza; HHT - hidroksiheptadekatrienoat; MDA - malonildialdehid; PG - prostaglandin, $PGES$ - PGE_2 sintaza; TX - tromboksan, $TXAS$ - TXA_2 sintaza; * COX - ispoljava i ciklooksigenaznu i peroksigenaznu aktivnost

Smatra se da su tokom homeostaze u sintezu PGE₂ iz arahidonske kiseline uključeni konstitutivno ekspresovani enzimi COX-1 kuplovana sa cPGES, i manje sa mPGES-2, dok je proinflamatorni PGE₂ sintetisan delovanjem inducibilnih enzima COX-2 i mPGES-1. Međutim, količina produkovanog PGE₂ u nekim patološkim stanjima kao što je ateroskleroza ne zavisi samo od ekspresije enzima uključenih u produkciju PGE₂, već i od ekspresije i nekih drugih enzima uključenih u metabolizam arahidonske kiseline kao što je npr. PGDS (Cipollone, 2015). Takođe, enzimi uključeni u degradaciju PGE₂ mogu da budu različito ekspresovani, na primer, uočena je smanjena produkcija 15-PGDH u tumorskim tkivima usled čega je produženo delovanje PGE₂. U pogledu receptora za PGE₂, uočena je različita ekspresija u zavisnosti od tipa ćelije. Smatra se da je inflamatorno delovanje PGE₂ ispoljeno prvenstveno nakon vezivanja za EP4 tip receptora (Ricciotti i FitzGerald, 2011).

TXA₂ je faktor agregacije trombocita, vazokonstriktor i bronhokonstriktor koji je neophodan za održavanje homeostaze organizma, prvenstveno kardiovaskularnog sistema. Sa druge strane, usled narušavanja regulatornih mehanizama organizma, dolazi do razvoja patoloških stanja u kojima učestvuje i TXA₂ (detaljan prikaz mehanizma delovanja i biološke funkcije TXA₂ je dat u *Poglavlju 4.3.*).

Uopšteno, kao što je prikazano na *Slici 6.1.*, u produkciji TXA₂ učestvuje nekoliko enzima. Smatrano je da je aktivnost TXAS kuplovana prvenstveno sa aktivnošću COX-1 (Caughey i sar., 2001), međutim, u nekim patološkim stanjima kao što je kancer prostate ili ateroskleroza, obe izoforme ciklooksigenaze obezbeđuju PGH₂ za TXAS (Nie i sar., 2004; Gabrielsen i sar., 2010). Dejstvom antagonista TP receptora, preko kojih TXA₂ ispoljava biološku funkciju, takođe mogu biti smanjeni neželjeni efekti povećane produkcije TXA₂ (Guerrero i sar., 2005; Navarro-Núñez i sar., 2009).

Imajući u vidu da smanjena produkcija PGE₂ i TXA₂ može da ima uticaj na supresiju inflamatornih procesa, a da prirodni proizvodi predstavljaju potentne, bezbedne, ali nedovoljno ispitane anti-inflamatorne agense, osnovni cilj ove doktorske disertacije je bilo ispitivanje potencijala sekundarnih metabolita biljaka - polifenolnih jedinjenja da inhibiraju produkciju PGE₂ i TXA₂ u procesima inflamacije. Odabrani *in vitro* model sistem su činile važne komponente imunog sistema - monociti ili makrofage (U937 ćelijska linija), u kojima je inflamacija, a samim tim i povećana produkcija PGE₂ i TXA₂, izazvana dodatkom lipopolisaharida (LPS), bakterijskog endotoksina koji snažno inicira inflamatorni proces, a uticaj različitih standardnih jedinjenja (polifenola), kao i kompleksnih smeša polifenola (ekstrakti bokvica i uzorci *Merlot* vina) na smanjenje nivoa produkcije PGE₂ i TXA₂ je praćen primenom HPLC-MS/MS tehnike.

2. Biološka (anti-inflamatorna) aktivnost polifenola i mehanizam njihovog delovanja kao modulatora metabolizma arahidonske kiseline

Polifenolna jedinjenja su sekundarni biljni metaboliti i jedni od glavnih nosilaca biološkog potencijala biljaka. Obuhvataju četiri osnovne klase jedinjenja: fenolne kiseline, lignane, stilbene i flavonoide. Poznato je da ishrana bogata namirnicama biljnog porekla koje sadrže polifenolna jedinjenja blagotvorno utiče na zdravlje. Kako se polifenolna jedinjenja u organizam retko unose pojedinačno, u ovom radu su, pored odabranih standardnih polifenola, kao bogati izvori ovih sekundarnih biomolekula korišćeni uzorci vina i ekstrakti bokvica. I vina i ekstrakti bokvica su poznati po

blagotvornom delovanju na organizam i imaju dugu tradiciju upotrebe u ishrani i narodnoj medicini (WHO 1999; Guilford i Pezzuto, 2011; Haddadian i sar., 2014; Gonçalves i Romano, 2016; Pavlidou i sar., 2018; Ji i sar., 2019; Fragopoulou i Antonopoulou, 2020).

U složenoj kaskadi inflamatornih procesa koji uključuju metabolizam arahidonske kiseline, nakon inicijalne stimulacije i pokretanja signalnog puta, ekspresija enzima na transkripcionom nivou predstavlja prvu fazu gde može biti izvršena modulacija ovog metaboličkog puta. Iako su za mnoga polifenolna jedinjenja delimično poznati mehanizmi delovanja na metabolizam arahidonske kiseline (*Poglavlje 4.6.2.*), uticaj polifenolnih jedinjenja na ekspresiju terminalnih enzima uključenih u produkciju PGE₂ i TXA₂ je bio predmet malog broja istraživanja. Zbog toga je jedan od ciljeva ove disertacije bilo i proučavanje mehanizma delovanja ispitivanih uzoraka na nivou regulacije ekspresije mRNK upravo ovih enzima.

Eksperimentalni deo istraživanja obuhvatao je sledeće faze:

1. Optimizacija *in vitro* model sistema
Određivanje optimalnih eksperimentalnih uslova za produkciju PGE₂ i TXA₂ u LPS-stimulisanim U937 monocitima i makrofagama;
2. Ispitivanje citotoksičnosti standardnih jedinjenja, ekstrakata bokvica i uzoraka vina
Odabir subtoksičnih koncentracija standardnih jedinjenja (7 fenolnih kiselina, 9 flavonoida, 2 metabolita flavonoida, 2 stilbena, 1 dihidrohalkon, 1 iridoid, 1 triterpenska kiselina, 4 sintetska jedinjenja, 4 standardna inhibitora COX-1/2 enzima), vodenih i metanolnih ekstrakata šest vrsta bokvica i 17 uzoraka *Merlot* vina;
3. Priprema i hemijska karakterizacija ekstrakata bokvica i uzoraka vina
Analiza sastava vodenih i metanolnih ekstrakata šest vrsta bokvica (*P. altissima* L., *P. argentea* Chaix 1785, *P. holesteum* Scop., *P. lanceolata* L. 1753, *P. major* L. 1753, *P. media* L. 1753) i 17 uzoraka *Merlot* vina (12 vina iz Srbije i 5 iz Francuske, Italije, Makedonije, Slovenije i Španije) primenom hromatografskih (HPLC-MS/MS, HPLC-UV/VIS, HPLC-DAD) i spektrofotometrijskih metoda (UV/VIS);
4. Određivanje uticaja ekstrakata bokvica na produkciju PGE₂ i TXA₂
Praćenje uticaja metanolnih i vodenih ekstrakata šest vrsta bokvica na:
 - produkciju PGE₂ i TXA₂ u nestimulisanim i LPS-stimulisanim monocitima primenom HPLC-MS/MS tehnike,
 - ekspresiju cPLA₂ α , COX-1/2, mPGES-1/2, cPGES i TXAS mRNA u LPS-stimulisanim monocitima primenom RT-qPCR,
 - produkciju PGE₂ i TXA₂ u LPS-stimulisanim makrofagama primenom HPLC-MS/MS tehnike;
5. Određivanje uticaja *Merlot* vina na produkciju PGE₂ i TXA₂
Praćenje uticaja uzoraka *Merlot* vina na:
 - produkciju PGE₂ i TXA₂ u LPS-stimulisanim makrofagama primenom HPLC-MS/MS tehnike,
 - ekspresiju cPLA₂ α , COX-1/2, mPGES-1/2, cPGES i TXAS mRNA u LPS-stimulisanim makrofagama primenom RT-qPCR;

6. Određivanje uticaja odabranih jedinjenja, prvenstveno polifenola na produkciju PGE₂ i TXA₂

Praćenje uticaja odabranih jedinjenja (3 fenolne kiseline, 9 flavonoida, 2 metabolita flavonoida, 2 stilbena, 1 dihidrohalkon, 1 iridoid, 1 triterpenska kiselina) na:

- produkciju PGE₂ i TXA₂ u nestimulisanim i LPS-stimulisanim monocitima primenom HPLC-MS/MS tehnike,
- ekspresiju cPLA₂α, COX-1/2, mPGES-1/2, cPGES i TXAS mRNK u LPS-stimulisanim monocitima primenom RT-qPCR;

Praćenje uticaja standardnih polifenolnih jedinjenja karakterističnih za vina (6 fenolnih kiselina, 3 flavonoida, 1 stilbena) na:

- produkciju PGE₂ i TXA₂ u LPS-stimulisanim makrofagama primenom HPLC-MS/MS tehnike,

7. Primena optimizovanog model sistema za ispitivanje anti-inflamatornog potencijala sintetskih jedinjenja

Praćenje uticaja četiri sintetska trifluorometil derivata na:

- produkciju PGE₂ i TXA₂ u LPS-stimulisanim makrofagama primenom HPLC-MS/MS tehnike
- ekspresiju cPLA₂α i COX-1/2 mRNK u LPS-stimulisanim makrofagama primenom RT-qPCR.

Nakon statističke obrade rezultata i korelacije hemijskog sastava i ispoljene aktivnosti, donesen je zaključak o anti-inflamatornom potencijalu ispitivanih standardnih jedinjenja, uzoraka vina i ekstrakata bokvica, odnosno njihovom uticaju na krajnji rezultat metabolizma arahidonske kiseline ciklooksigenaznim putem - produkciju PGE₂ i TXA₂, kao i mehanizam delovanja ispitivanih standardnih jedinjenja, ekstrakata bokvica i uzoraka *Merlot* vina na genskom nivou.

Istraživačka grupa u okviru koje je u urađena ova doktorska disertacija bavi se proučavanjem biološke aktivnosti lekovitog bilja i dijetetskih suplemenata, a prikazani rezultati u ovoj doktorskoj disertaciji su zapravo deo ovih opsežnih istraživanja. Na odabir specifičnog model sistema u kojem će se ispitivati ekstrakti bokvica, uzorci vina i polifenolna jedinjenja uticalo je više faktora: rezultati dosadašnjih istraživanja, potreba za opštom karakterizacijom biološke aktivnosti ispitivanih uzoraka, kao i neophodnost utvrđivanja mehanizama njihovog delovanja.

Na primer, vina su poznata po kardioprotektivnom delovanju, a u patogenezi jedne od najčešćih kardiovaskularnih oboljenja modernog doba, ateroskleroze, oksidativni stres i inflamacija imaju ključnu ulogu. Pored toga što su prepoznate kao odličan *in vitro* model sistem inflamacije, makrofage imaju ključnu ulogu u razvoju aterosklerotskog plaka. Imajući u vidu navedene činjenice, uticaj vina na produkciju PGE₂ i TXA₂ ispitan je upravo u makrofagama u kojima je inflamacija izazvana dodatkom LPS.

Sa druge strane, samo za najpoznatije vrsta bokvica (*P. lanceolata* i *P. major*) postoje malobrojni podaci o uticaju na metabolizam arahidonske kiseline, dobijeni korišćenjem uobičajenog model sistema inflamacije - makrofaga miševa ili izolovanih enzima. S obzirom na nedostatak podataka o delovanju drugih vrsta bokvica, posebno vodenih ekstrakata, tj. čajeva (infuza) koji predstavljaju oblik u kom se najčešće konzumiraju bokvice, odabrano je ispitivanje njihovog uticaja na produkciju PGE₂ i

TXA₂ u model sistemu nestimuliranih monocita (model homeostaze), kao i monocita u kojima je inflamacija izazvana dodatkom LPS (model rane faze inflamacije).

Takođe, za većinu analiziranih prirodnih proizvoda postoje podaci o anti-inflamatornom delovanju u smislu inhibicije produkcije proizvoda makrofaga, ali gotovo da nema podataka o njihovoj interakciji sa monocitima u procesima inflamacije, pa je u ovom radu analiziran njihov uticaj u model sistemu nestimuliranih monocita (model homeostaze), kao i monocita u kojima je inflamacija izazvana dodatkom LPS (model rane faze inflamacije).

6.1. Optimizacija metode

Kao što je navedeno u *Poglavlju 4.5.*, postoji veliki broj *in vitro* i *in vivo* metoda koje se koriste za proučavanje metabolizma arahidonske kiseline. Eksperimenti u *in vivo* model sistemima pružaju najveći broj podataka, jer je moguće pratiti i apsorpciju i metabolizam potencijalnih modulatora. Takođe, moguće je paralelno odrediti i njihov uticaj na ekspresiju i aktivnost svih enzima koji učestvuju u metabolizmu arahidonske kiseline u različitim tkivima i ćelijama. Ova istraživanja su neophodna pre kliničkih ispitivanja, međutim nisu pogodna za preliminarna ispitivanja i prve faze evaluacije aktivnosti velikog broja jedinjenja. Za primarni skrining koristi se različite *in vitro* metode od koji svaka ima određene prednosti i nedostatke.

Istraživačka grupa u okviru koje je urađena ova doktorska disertacija se već dugi niz godina bavi proučavanjem metabolizma arahidonske kiseline (Beara i sar., 2010; Beara i sar., 2012; Lesjak i sar., 2013; Lesjak i sar., 2018). Prvobitna ispitivanja su vršena na humanim trombocitima dobijenim iz Zavoda za transfuziju krvi u Novom Sadu koji su zastareli za medicinsku upotrebu. U eksperimentima na humanim trombocitima praćena je aktivnost COX-1 (produkcija 12-HHT, PGE₂ i TXA₂) i 12-LOX (12-HETE). Trombociti su aktivirani dodatkom kalcijumove jonofore (A23187, 5 µmol/L) i CaCl₂ (2 mmol/L), a metaboliti su detektovani primenom visoko specifične HPLC-MS/MS tehnike uz korišćenje PGB₂ kao internog standarda.

Trombociti predstavljaju odličan model sistem za praćenje uticaja na ekspresiju i aktivnost enzima koji su uključeni u produkciju TXA₂. Međutim, u trombocitima ne postoji COX-2, jedan od najznačajnijih proinflamatornih enzima, pa ovaj model sistem ne može da se koristi za ispitivanje uticaja na produkciju lipidnih medijatora, prvenstveno PGE₂, u inflamaciji. Osim toga, ovako izolovani humani trombociti nisu pogodni za rutinske analize, jer je proces izolovanja vremenski zahtevan, ćelije su veoma osetljive, a količine dostupnih jedinica za eksperiment zavise od potreba Kliničkog centra Vojvodine i broja dobrovoljnih davalaca krvi, te je teško planirati eksperimente. Najveći nedostatak upotrebe ovog model sistema je etičke prirode, jer su se, nažalost, tokom godina povećale potrebe Kliničkog centra Vojvodine za jedinicama trombocita, usled čega retko preostanu jedinice koje su zastarele za medicinsku upotrebu, te za eksperimente mogu da se koriste samo trombociti koji su pogodni za kliničku upotrebu.

U cilju prevazilaženja navedenih nedostataka, kao novi model sistem odabrana je kontinualna ćelijska linija humanih leukemijskih monocita U937. Osnovna prednost ovog model sistema je to što su U937 monociti komercijalna ćelijska linija, koja je pogodna za rutinsku analizu većeg broja uzoraka. Monociti imaju veoma važnu ulogu u imunom odgovoru, migriraju do mesta upale, a nakon ulaska u tkiva transformišu se u makrofage koje učestvuju u uklanjanju inflamatornog stimulusa. Zbog toga predstavljaju zanimljiv model sistem za proučavanja metabolizma arahidonske kiseline u inflamaciji.

S obzirom da je u netretiranim monocitima ekspresovana samo COX-1, a ekspresija COX-2 može da se indukuje dejstvom LPS-a (Wong i sar., 1997; Demasi i sar., 2000; Penglis i sar., 2000; Kato i sar., 2001), monociti mogu da se koriste za analizu aktivnosti obe COX izoforme. Upotrebom istog model sistema, prevazilaze se nedostaci koji potiču

od različitih eksperimentalnih uslova, kao što su ćelije različitog porekla, tip stimulacije i slično, pa efekti ispitivanog jedinjenja na COX-1 i COX-2 mogu da se porede (Demasi i sar., 2000; Kato i sar., 2001). Sa druge strane, monociti i makrofage predstavljaju funkcionalno i morfološki različite ćelije, usled čega eksperimenti na ovim model sistemima pružaju podatke o metabolizmu arahidonske kiseline tokom različitih fizioloških procesa.

U937 ćelijska linija je veoma često korišćena za proučavanje metabolizma arahidonske kiseline (Sanduja i sar., 1991; Wong i sar., 1997; Penglis i sar., 2000; Rioux i Castonguay, 2000; Jiang i sar., 2003a; Jiang i sar., 2003b). Međutim, primenjeni eksperimentalni uslovi se razlikuju po korišćenim stimulusima, vremenu inkubacije i metodama praćenja produkcije različitih proizvoda.

Sanduja i saradnici (1991) su pratili metabolizam arahidonske kiseline u više leukemijskih ćelijskih linija (THP-1, ML-1, U937, KG-1). Potencijal ćelija da metabolišu egzogenu arahidonsku kiselinu određen je nakon inkubacije sa ^{14}C -obeleženom arahidonskom kiselinom ($10.0 \mu\text{mol/L}$, 10 minuta), dok je sposobnost metabolisanja endogene arahidonske kiseline analizirana nakon dodatka kalcijumove jonofore A23187 tokom 10, 30 i 60 minuta (na ćelije prethodno obeležene $2 \mu\text{mol/L}$ ^{14}C arahidonskom kiselinom). Takođe, poredili su metabolizam arahidonske kiseline u nediferenciranim i PMA (72-96 h) diferenciranim ćelijama inkubiranim sa kalcimicinom (A23187, $10.0 \mu\text{mol/L}$, 30 minuta).

Wong i saradnici (1997) su pokazali da je u U937 ćelijskoj liniji ekspresovana samo COX-1, a ne i COX-2. Nakon desetominutne inkubacije sa arahidonskom kiselinom ($10 \mu\text{mol/L}$) određivali su nivo produkovanog PGE_2 odgovarajućim RIA kompletom, a ovaj model sistem su koristili za određivanje selektivne inhibicije COX-1.

Penglis i saradnici (2000) su pratili produkciju PGE_2 i TXA_2 u primarnim monocitima i U937 monocitima koji su tokom četiri minuta bili inkubirani sa različitim koncentracijama arahidonske kiseline ($0-100 \mu\text{mol/L}$). Odvojeno su pratili kinetiku produkcije PGE_2 i TXA_2 nakon dodatka arahidonske kiseline i u primarnim monocitima aktiviranim dodatkom LPS (20.0 ng/mL , 24 h) i U937 monocitima koji su aktivirani 1α -25-dihidroksi vitaminom D3 (9.80 nmol/L) i humanim serumom tretiranim zimožanom (100 ng/mL , 24 h). Koncentraciju PGE_2 i TXA_2 su određivali RIA kompletom, a utvrdili su da eksperimenti na U937 ćelijama i primarnim monocitima daju iste rezultate.

Još nekoliko autora je koristilo primarne humane ili životinjske monocite za praćenje aktivnosti COX-1/2. Monociti tretirani različitim koncentracijama arahidonske kiseline ($10 \mu\text{mol/L}$, 15 minuta, Demasi i sar., 2000; $3 \mu\text{mol/L}$, 15 minuta, Kato i sar., 2001) korišćeni su za određivanje inhibicije COX-1. Sa druge strane, monociti pretretirani aspirinom ($10 \mu\text{g/mL}$, 30 minuta, Demasi i sar., 2000; $300 \mu\text{mol/L}$, 2 h, Kato i sar., 2001), a zatim tretirani LPS-om (200 ng/mL , 16 h, Demasi i sar., 2000; $10 \mu\text{g/mL}$, 20h, Kato i sar., 2001) i inkubirani sa arahidonskom kiselinom (navedene koncentracije i vreme inkubacije) su korišćeni za određivanje selektivne inhibicije COX-2. Takođe, u nekim radovima, nakon dodatka LPS, monociti su stimulirani dodatkom kalcimicina ($1 \mu\text{mol/L}$, 15 minuta, Demasi i sar., 2000; $0.5 \mu\text{mol/L}$, 30-60 minuta, Karlsson i sar., 2010), zimožana (0.5 mg/mL , 30-60 minuta, Karlsson i sar., 2010) ili PMA (150 nmol/L , 30-60 minuta, Karlsson i sar., 2010).

Jedan od ciljeva ove doktorske disertacije bio je da se prilagode eksperimentalni uslovi koji bi bili pogodni za praćenje uticaja biljnih ekstrakata i izolovanih prirodnih proizvoda na produkciju PGE₂ i TXA₂ u U937 ćelijskoj liniji. U cilju odabira optimalnih uslova za praćenje uticaja na produkciju PGE₂ i TXA₂ u monocitima varirano je nekoliko eksperimentalnih uslova.

Prvi korak je bilo ispitivanje uticaja na ekspresiju mRNA enzima koji su uključeni u produkciju PGE₂ i TXA₂. Zbog racionalizacije, prvenstveno je praćen uticaj na ekspresiju COX-1, COX-2 i cPLA₂α mRNA, dok je uticaj na mRNA terminalnih enzima produkcije PGE₂ i TXA₂ određen samo za one probe koje su se izdvojile kao najbolje.

U *Tabeli 6.1.* prikazani su rezultati eksperimenata u kojima je analiziran uticaj kalcimicina i CaCl₂ na ekspresiju COX-1, COX-2 i cPLA₂α mRNA. Svi eksperimenti su rađeni u RPMI-1640 medijumu, koji je sadržao 2.05 mmol/L L-glutamina, 25.0 mmol/L HEPES, 100 U/mL penicilina, 0.10 mg/mL streptomocina i 0.25 µg/mL amfotericina B, a nije sadržao FBS. CaCl₂ je dodat dva minuta nakon dodatka kalcimicina.

Smatra se da dodatak navedenih jedinjenja aktivira cPLA₂α, što je praćeno oslobađanjem endogene arahidonske kiseline. U najvećem broju objavljenih radova, praćen je uticaj kalcimicina na produkciju PGE₂ i TXA₂, a ne i na ekspresiju mRNA enzima uključenih u njihovu produkciju. Često je prvo indukovana povišena ekspresija enzima, a tek zatim dodat kalcimicin da se oslobodi supstrat, endogena arahidonska kiselina (Sanduja i sar., 1991; Demasi i sar., 2000).

Tabela 6.1. Optimizacija uslova za praćenje uticaja na ekspresiju* cPLA₂α i COX-1/2 mRNA u U937 monocitima[‡] (A23187 i CaCl₂):

Proba	Broj ćelija/ mL	Vreme inkubacije pre aktivacije	Koncentracija A23187	Koncentracija CaCl ₂	Inkubacija	Ekspresija cPLA ₂ α mRNA (normalizovane vrednosti ekspresije: cPLA ₂ α mRNA/GAPDH mRNA)		Ekspresija COX-1 mRNA (normalizovane vrednosti ekspresije: COX-1 mRNA/GAPDH mRNA)		Ekspresija COX-2 mRNA (ΔCt)	
						Proba [§] (tretirani monociti)	Kontrola (netretirani monociti)	Proba (tretirani monociti)	Kontrola (netretirani monociti)	ΔCt COX-2	ΔCt COX-1 Proba/Kontrola
1	1 × 10 ⁶	24 h	28.5 nmol/L	10 μmol/L	15 minuta	0.75 ± 0.07 ^b	1.00 ± 0.06 ^a	1.15 ± 0.07 ^a	1.00 ± 0.06 ^a	10.50	6.56/6.77
2	1 × 10 ⁶	24 h	28.5 nmol/L	10 μmol/L	30 minuta	0.74 ± 0.01 ^b	1.00 ± 0.21 ^a	0.73 ± 0.07 ^a	1.00 ± 0.14 ^a	10.21	6.91/6.47
3	1 × 10 ⁶	24 h	28.5 nmol/L	10 μmol/L	45 minuta	0.44 ± 0.11 ^a	1.00 ± 0.44 ^a	0.67 ± 0.05 ^a	1.00 ± 0.26 ^a	10.16	6.56/6.98
4	1 × 10 ⁶	24 h	28.5 nmol/L	10 μmol/L	60 minuta	1.00 ± 0.46 ^a	1.00 ± 0.06 ^a	1.10 ± 0.25 ^a	1.00 ± 0.17 ^a	10.15	6.69/6.67
5	1 × 10 ⁶	24 h	28.5 nmol/L	10 μmol/L	90 minuta	1.04 ± 0.12 ^a	1.00 ± 0.13 ^a	1.30 ± 0.19 ^a	1.00 ± 0.17 ^a	11.02	6.22/6.36
6	1 × 10 ⁶	24 h	28.5 nmol/L	10 μmol/L	120 minuta	0.92 ± 0.04 ^a	1.00 ± 0.15 ^a	0.93 ± 0.28 ^a	1.00 ± 0.14 ^a	10.78	6.39/6.25
7	1 × 10 ⁶	24 h	42.75 nmol/L	10 μmol/L	30 minuta	1.08 ± 0.17 ^a	1.00 ± 0.14 ^a	0.74 ± 0.14 ^a	1.00 ± 0.04 ^a	9.87 +	7.70/7.16
8	1 × 10 ⁶	24 h	42.75 nmol/L	10 μmol/L	45 minuta	0.84 ± 0.20 ^a	1.00 ± 0.08 ^a	0.81 ± 0.06 ^a	1.00 ± 0.23 ^a	9.96 +	6.74/6.67
9	1 × 10 ⁶	24 h	42.75 nmol/L	10 μmol/L	60 minuta	1.23 ± 0.01 ^b	1.00 ± 0.03 ^a	0.75 ± 0.48 ^a	1.00 ± 0.19 ^a	10.11	7.16/6.59
10	1 × 10 ⁶	24 h	42.75 nmol/L	10 μmol/L	90 minuta	2.60 ± 1.07 ^a	1.00 ± 0.57 ^a	1.69 ± 0.36 ^a	1.00 ± 0.57 ^a	10.59	6.72/7.59
11	1 × 10 ⁶	24 h	42.75 nmol/L	10 μmol/L	120 minuta	1.26 ± 0.28 ^a	1.00 ± 0.31 ^a	0.95 ± 0.21 ^a	1.00 ± 0.17 ^a	10.75	6.94/7.06
12	1 × 10 ⁶	24 h	5 μmol/L	2 mmol/L	5 minuta	1.29 ± 0.17 ^a	1.00 ± 0.16 ^a			9.37+	/7.23
13	1 × 10 ⁶	24 h	5 μmol/L	2 mmol/L	10 minuta	0.82 ± 0.10 ^a	1.00 ± 0.27 ^a	0.87 ± 0.09 ^a	1.00 ± 0.22 ^a	12.13	7.10/6.92
14	1 × 10 ⁶	24 h	5 μmol/L	2 mmol/L	30 minuta	1.99 ± 0.76 ^a	1.00 ± 0.27 ^a	1.97 ± 0.81 ^a	1.00 ± 0.27 ^a	8.29 ++	6.63/7.46
15	1 × 10 ⁶	24 h	5 μmol/L	2 mmol/L	30 minuta [#]	0.85 ± 0.05 ^a	1.00 ± 0.05 ^a	1.87 ± 0.30 ^b	1.00 ± 0.13 ^a	9.76++	6.75/7.24

*srednja vrednost bar 3 ponavljanja; [‡]Svi eksperimenti su rađeni u RPMI-1640 medijumu, koji je sadržao 2.05 mmol/L L-glutamina, 25.0 mmol/L HEPES, 100 U/mL penicilina, 0.10 mg/mL streptomicina i 0.25 μg/mL amfotericina B, a nije sadržao FBS; [§]Različita slova (a-b) u eksponentu u istom redu tabele ukazuju na statistički značajnu razliku od kontrole, pri nivou značajnosti od ≤ 0.05 (na osnovu t-testa); [#]Eksperimenti u prisustvu DMSO;+ smatramo da je povećana ekspresija COX-2 (broj + srazmeran intenzitetu ekspresije).

Tabela 6.2. Optimizacija uslova za praćenje uticaja na ekspresiju* *mPGES-1*, *mPGES-2* i *TXAS* mRNK u U937 monocitima[‡] (A23187 i CaCl₂):

Proba	Broj ćelija/ mL	Vreme inkubacije pre aktivacije	Koncentracija A23187	Koncentracija CaCl ₂	Inkubacija	Ekspresija <i>mPGES-1</i> mRNAK (normalizovane vrednosti ekspresije: <i>mPGES-1</i> mRNAK/GAPDH mRNAK)		Ekspresija <i>mPGES-2</i> mRNAK (normalizovane vrednosti ekspresije: <i>mPGES-2</i> mRNAK/GAPDH mRNAK)		Ekspresija <i>TXAS</i> mRNAK (normalizovane vrednosti ekspresije: <i>TXAS</i> mRNAK/GAPDH mRNAK)	
						Proba [§] (tretirani monociti)	Kontrola (netretirani monociti)	Proba (tretirani monociti)	Kontrola (netretirani monociti)	Proba (tretirani monociti)	Kontrola (netretirani monociti)
15	1 × 10 ⁶	24 h	5 μmol/L	2 mmol/L	30 minuta	3.81 ± 2.77 ^a	1.00 ± 0.55 ^a	0.73 ± 0.11 ^a	1.00 ± 0.16 ^a	0.54 ± 0.21 ^b	1.00 ± 0.10 ^a

*srednja vrednost bar 3 ponavljanja; [‡]Svi eksperimenti su rađeni u RPMI-1640 medijumu, koji je sadržao 2.05 mmol/L L-glutamina, 25.0 mmol/L HEPES, 100 U/mL penicilina, 0.10 mg/mL streptomicina i 0.25 μg/mL amfotericina B, a nije sadržao FBS; [§]Različita slova (a-b) u eksponentu u istom redu tabele ukazuju na statistički značajnu razliku od kontrole, pri nivou značajnosti od ≤ 0.05 (na osnovu t-testa); [#]Eksperimenti u prisustvu DMSO.

U nestimulisanim monocitima nije ekspresovana COX-2, usled čega nije moguće tačno kvantifikovati povećanje ekspresije mRNA COX-2 nakon dodatka stimulusa, po metodi određivanja relativne ekspresije koja je korišćena za obradu podataka (Livak i Schmittgen, 2001). Zato je relativno povećanje ekspresije predstavljeno kao ΔCt (razlika Ct COX-2 mRNA i GAPDH mRNA; Ct - *cycle threshold*, broj ciklusa potreban da fluorescentni signal pređe prag). S obzirom da Ct za GAPDH može malo da varira između različitih eksperimenata, paralelno su prikazane i vrednosti ΔCt COX-1 mRNA u tretiranim i ne tretiranim monocitima. Uočava se da su ΔCt COX-1 mRNA relativno stabilne (približno 7), dok su ΔCt vrednosti za COX-2 uglavnom veće (oko 10), što znači da iako dolazi do ekspresije, prisutno je znatno manje mRNA ovog enzima. Smanjena ΔCt COX-2 mRNA u probama (7, 8, 12, 14, 15) znači da je došlo do značajnijeg povećanja ekspresije COX-2 mRNA, jer manja razlika u Ct vrednostima ukazuje na prisustvo veće količine COX-2 mRNA.

Na osnovu rezultata prikazanih u *Tabeli 6.1.* ne može se uočiti pravilnost o uticaju na ekspresiju COX-1, COX-2 i cPLA₂ α mRNA u zavisnosti od koncentracije dodatih aktivatora i vremena inkubacije. Međutim, uočava se da je prilikom inkubacije sa A23187 (5 $\mu\text{mol/L}$) i CaCl₂ (2 mmol/L) u toku 30 minuta povećana ekspresija COX-1, COX-2 mRNA (*Tabela 6.1.*), a smanjena ekspresija TXAS mRNA (*Tabela 6.2.*). Na osnovu prikazanih rezultata, može da se pretpostavi da bi ćelije tretirane ovim aktivatorima predstavljale bolji model sistem za praćenje uticaja na produkciju PGE₂ nego TXA₂.

Takođe, analiziran je i uticaj arahidonske kiseline, LPS i PMA na ekspresiju mRNA navedenih enzima u monocitima (*Tabela 6.3.* i *6.4.*). Egzogeni arahidonska kiselina se obično dodaje kao supstrat, a monociti uz dodatak samo arahidonske kiseline se koriste kao model sistem za ispitivanje uticaja na COX-1, bez uticaja na COX-2. Međutim, uočava se da tokom 15 minuta inkubacije sa arahidonskom kiselinom (10 $\mu\text{mol/L}$) dolazi do ekspresije mRNA COX-2 (proba 18). Iako ova povećana ekspresija na transkripcionom nivou ne mora da znači da je povećana i ekspresija COX-2 proteina za isti vremenski period, neophodno je uzeti u obzir i ovu mogućnost. Zato prilikom određivanja selektivne inhibicije COX-1 inkubacija ćelija u prisustvu arahidonske kiseline treba da traje do 10 minuta.

Za razliku od dodatka kalcimicina i arahidonske kiseline, u prethodnim studijama tretman U937 ćelija sa PMA i LPS primenjivan je kako za monitoring promene ekspresije mRNA enzima, tako i produkcije PGE₂ i TXA₂. PMA se koristi za diferencijaciju monocita u makrofage, dok je LPS jedan od najčešće korišćenih agenasa za indukciju inflamacije.

Rezultati prikazani u *Tabeli 6.3* su u skladu sa rezultatima prethodnih studija u kojima je pokazano da nakon tretmana sa LPS dolazi do ekspresije COX-2 u monocitima (Demasi i sar., 2000; Kato i sar., 2001; Karlsson i sar., 2010).

Tabela 6.3. Optimizacija uslova za praćenje uticaja na ekspresiju* *cPLA₂α* i *COX-1/2* mRNK u U937 monocitima[‡] (arahidonska kiselina, LPS, PMA)

Proba	Broj ćelija/mL	Vreme inkubacije pre aktivacije	Aktivator	Koncentracija	Vreme inkubacije sa aktivatorom	Ekspresija <i>cPLA₂α</i> (normalizovane vrednosti ekspresije: <i>cPLA₂α</i> mRNK/GAPDH mRNK)		Ekspresija <i>COX-1</i> (normalizovane vrednosti ekspresije: <i>COX-1</i> mRNK/GAPDH mRNK)		Ekspresija <i>COX-2</i>	
						Proba [§] (tretirani monociti)	Kontrola (netretirani monociti)	Proba (tretirani monociti)	Kontrola (netretirani monociti)	ΔCt <i>COX-2</i>	ΔCt <i>COX-1</i> Proba/Kontrola
16	1 × 10 ⁶	24 h	Arahidonska k.	10 μmol/L	5 minuta	1.40 ± 0.35 ^a	1.00 ± 0.23 ^a	0.96 ± 0.08 ^a	1.00 ± 0.19 ^a	13.37	7.74/7.70
17	1 × 10 ⁶	24 h	Arahidonska k.	10 μmol/L	10 minuta	0.83 ± 0.18 ^a	1.00 ± 0.03 ^a	0.87 ± 0.18 ^a	1.00 ± 0.15 ^a	13.07	7.51/7.43
18	1 × 10 ⁶	24 h	Arahidonska k.	10 μmol/L	15 minuta	0.78 ± 0.16 ^a	1.00 ± 0.31 ^a	0.90 ± 0.13 ^a	1.00 ± 0.14 ^a	7.54++	7.23/7.05
19	1 × 10 ⁶	24 h	LPS	200 ng/mL	8 h	1.11 ± 0.24 ^a	1.00 ± 0.07 ^a	1.05 ± 0.07 ^a	1.00 ± 0.06 ^a	8.82++	7.11/7.17
20	1 × 10 ⁶	24 h	LPS	200 ng/mL	16 h	1.56 ± 0.01 ^a	1.00 ± 0.55 ^a	2.30 ± 0.40 ^a	1.00 ± 1.09 ^a	10.28	6.4/8.78
21	1 × 10 ⁶	24 h	LPS	200 ng/mL	24 h	1.52 ± 0.17 ^a	1.00 ± 0.25 ^a	0.76 ± 0.16 ^a	1.00 ± 0.28 ^a	7.60++	7.12/6.73
22	1 × 10 ^{6*}	4 h	LPS [‡]	200 ng/mL	20 h	2.17 ± 0.81 ^a	1.00 ± 0.34 ^a	0.90 ± 0.13 ^a	1.00 ± 0.50 ^a	4.67+++	7.54/7.47
23	1 × 10 ⁶	1 h	LPS	500 ng/mL	20 h	2.11 ± 0.53 ^a	1.00 ± 0.04 ^a	0.64 ± 0.15 ^b	1.00 ± 0.16 ^a	5.06+++	7.58/6.91
24	1 × 10 ⁶	4 h	LPS [‡]	500 ng/mL	20 h	2.45 ± 0.30 ^a	1.00 ± 0.38 ^a	0.53 ± 0.11 ^a	1.00 ± 0.50 ^a	5.05+++	7.79/6.95
25	1 × 10 ⁶	3 h	LPS	500 ng/mL	20 h	0.91 ± 0.38 ^a	1.00 ± 0.21 ^a	0.91 ± 0.16 ^a	1.00 ± 0.18 ^a	13.1	12.0/11.6
26	1 × 10 ⁶	20 h	LPS	500 ng/mL	20 h	2.39 ± 0.55 ^b	1.00 ± 0.29 ^a	0.68 ± 0.15 ^a	1.00 ± 0.12 ^a	9.89+	7.22/6.65
27	1 × 10 ⁶	24 h	PMA	100 nmol/L	8 h	1.98 ± 0.20 ^b	1.00 ± 0.25 ^a	1.69 ± 0.12 ^b	1.00 ± 0.24 ^a	8.80++	6.49/7.27
28	1 × 10 ⁶	24 h	PMA	100 nmol/L	16 h	2.03 ± 0.72 ^a	1.00 ± 0.06 ^a	1.98 ± 0.72 ^a	1.00 ± 0.39 ^a	8.21++	6.40/7.42
29	1 × 10 ⁶	24 h	PMA	100 nmol/L	24 h	1.03 ± 0.27 ^a	1.00 ± 0.26 ^a	2.32 ± 0.55 ^b	1.00 ± 0.31 ^a	7.95++	6.17/7.52

*srednja vrednost bar 3 ponavljanja; [‡]Eksperimenti su rađeni u RPMI-1640 medijumu, koji je sadržao 2.05 mmol/L L-glutamina, 25.0 mmol/L HEPES, 100 U/mL penicilina, 0.10 mg/mL streptomicina i 0.25 μg/mL amfotericina B, a nije sadržao FBS; [‡]Eksperimenti su rađeni u RPMI-1640 medijumu, koji je sadržao 2.05 mmol/L L-glutamina, 25.0 mmol/L HEPES, 100 U/mL penicilina, 0.10 mg/mL streptomicina, 0.25 μg/mL amfotericina B i 10% FBS; [§] Različita slova (a-b) u eksponentu u istom redu tabele ukazuju na statistički značajnu razliku od kontrole, pri nivou značajnosti od ≤ 0.05 (na osnovu t-testa); + smatramo da je povećana ekspresija *COX-2* (broj + srazmeran intenzitetu ekspresije).

Tabela 6.4. Optimizacija uslova za praćenje uticaja na ekspresiju* mPGES-1, mPGES-2 i TXAS mRNK u monocitima[‡] (LPS)

Proba	Broj ćelija/mL	Vreme inkubacije pre aktivacije	Aktivator	Koncentracija	Vreme inkubacije	Ekspresija mPGES-1 (normalizovane vrednosti ekspresije: mPGES-1 mRNK/GAPDH mRNK)		Ekspresija mPGES-2 (normalizovane vrednosti ekspresije: mPGES-2 mRNK/GAPDH mRNK)		Ekspresija TXAS (normalizovane vrednosti ekspresije: TXAS mRNK/GAPDH mRNK)	
						Proba [§] (tretirani monociti)	Kontrola (netretirani monociti)	Proba (tretirani monociti)	Kontrola (netretirani monociti)	Proba	Kontrola
25	1 × 10 ⁶	3 h	LPS	500 ng/mL	20 h	2.59 ± 0.91 ^b	1.00 ± 0.10 ^a	1.16 ± 0.53 ^a	1.00 ± 0.11 ^a	0.85 ± 0.15 ^a	1.00 ± 0.09 ^a
26	1 × 10 ⁶	20 h	LPS	500 ng/mL	20 h	2.66 ± 0.92 ^a	1.00 ± 0.75 ^a	0.71 ± 0.13 ^a	1.00 ± 0.44 ^a	0.95 ± 0.22 ^a	1.00 ± 0.46 ^a

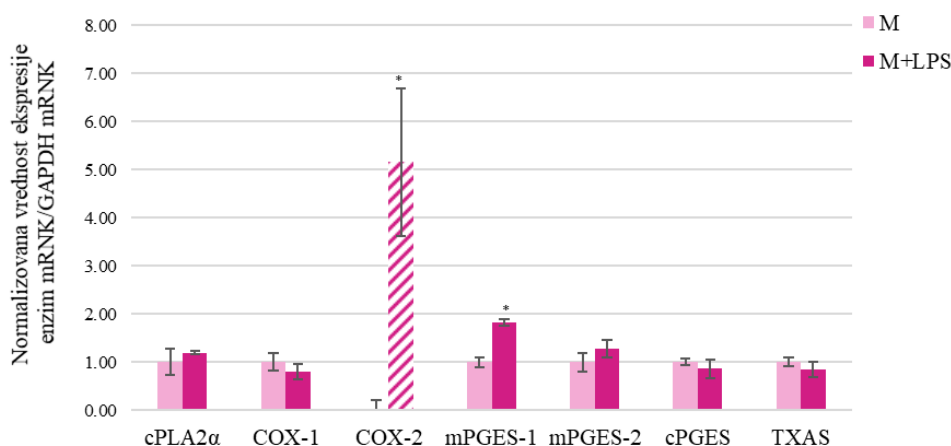
*srednja vrednost bar 3 ponavljanja; [‡]Eksperimenti su rađeni u RPMI-1640 medijumu, koji je sadržao 2.05 mmol/L L-glutamina, 25.0 mmol/L HEPES, 100 U/mL penicilina, 0.10 mg/mL streptomicina i 0.25 µg/mL amfotericina B, a nije sadržao FBS; [§]Različita slova (a-b) u eksponentu u istom redu tabele ukazuju na statistički značajnu razliku od kontrole, pri nivou značajnosti od ≤ 0.05 (na osnovu t-testa).

Uočava se da je ekspresija COX-2 mRNA povećana više ukoliko se inkubacija vrši u medijumu koji sadrži i 10% FBS. Međutim, s obzirom da sastav FBS može znatno da varira u zavisnosti od porekla i tako utiče na rezultate eksperimenta, odabrani su eksperimentalni uslovi u kojima se koristi medijum bez FBS. U pogledu korišćenih koncentracija LPS, zapaža se neznatno jača ekspresija COX-2 mRNA pri koncentraciji od 500 ng/mL (proba 23 – 26) nego pri koncentraciji od 200 ng/mg (proba 19 – 22). Paralelno sa COX-2, povećana je ekspresija i mPGES-1 i cPLA₂α mRNA, pri čemu ekspresija cPLA₂α mRNA nije uvek i nije statistički značajno povećana. U radu Karlsson i saradnici (2010), ekspresija mPGES-1 je povećana 5 puta, dok je ekspresija cPLA₂α povećana približno za 80%, ali ne i statistički značajno, što je u skladu sa rezultatima prikazanim u *Tabeli 6.3. i 6.4.* Nasuprot tome, uočava se da je u pojedinim probama smanjena ekspresija COX-1 mRNA nakon dodatka LPS. Iako na prvi pogled iznenađujući, jer je COX-1 konstitutivno ekspresovan enzim, ovaj uticaj LPS je primećen i u prethodnim studijama na monocitima (Beyan i sar., 2006).

PMA je jedan od agenasa koji se, pored vitamina D i retinoinske kiseline najčešće koristi za diferencijaciju monocita u makrofage. U okviru ove teze ispitan je uticaj PMA na ekspresiju COX-1, COX-2 i cPLA₂α mRNA u monocitima nakon inkubacije tokom 8, 16 ili 24 sata (probe 27 – 29). Navedeni periodi inkubacije su suviše kratki da bi se monociti diferencirali u makrofage. Uočava se da tokom inkubacije sa PMA dolazi do blage, vremenski zavisne povećane ekspresija COX-1 mRNA, i COX-2 mRNA, dok je ekspresija cPLA₂α mRNA blago povećana tokom 8 i 16 sati, a nepromenjena nakon 24 sata inkubacije U937 monocita u prisustvu PMA. Navedeni rezultati su donekle u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima da dolazi do povećanja ekspresije cPLA₂α proteina nakon 8 sati, a smanjenja nakon 24 sata (Jiang i sar., 2003a), što znači da ćelije korišćene u okviru ove teze ispoljavaju istu osetljivost i odgovor kao ćelije koje su ranije korišćene za proučavanje mehanizma arahidonske kiseline.

Na osnovu prikazanih rezultata odabrani su optimalni uslovi za ispitivanje uticaja prirodnih proizvoda na ekspresiju enzima uključenih u produkciju PGE₂ i TXA₂. U svaki otvor 6-well mikrotitar ploče dodato je 2 mL suspenzije monocita (1×10⁶ monocita /mL) u RPMI-1640 medijumu bez seruma. Nakon 1 sata inkubacije, dodata je odgovarajuća zapremina inhibitora, a nakon 2 sata inkubacije, inflamacija je izazvana dodatkom 1 μL LPS (1 mg/mL, konačna koncentracija 500 ng/mL) i ćelije su inkubirane narednih 20 sati. Ekspresija mRNA enzima uključenih u produkciju PGE₂ i TXA₂ normalizovana je na mRNA gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaze (*GAPDH*), referentnog gena. Relativna ekspresija gena normalizovana je u odnosu na kontrolu koja predstavlja netretirane U937 monocite i koja iznosi 1. Na *Histogramu 6.1* prikazani su rezultati promene ekspresije mRNA za enzime cPLA₂α, COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2, cPGES i TXAS u netretiranim monocitima i nakon izazivanja inflamacije dodatkom LPS. S obzirom da COX-2 nije ekspresovana u monocitima, nije moguće kvantifikovati koliko je povećana ekspresija, ali uočava se da do ekspresije dolazi. Kao što se vidi sa priloženog *Histograma 6.1.*, pri uslovima koji su odabrani kao optimalni dolazi do promene ekspresije samo COX-2 i mPGES-1, međutim, u narednim eksperimentima će se pratiti

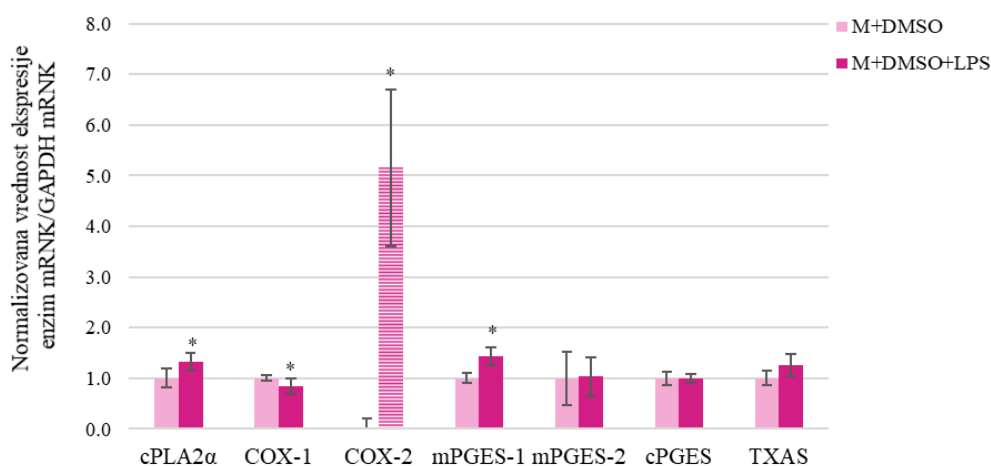
uticaj na mRNK svih enzima, jer su svi doprinose produkciji i krajnoj količini PGE₂ i TXA₂.



Histogram 6.1. Ekspresija mRNA ispitivanih enzima[‡] u nestimulisanim i LPS-stimulisanim monocitima

*statistički značajno različito od kontrole ($p \leq 0.05$), [‡]povećanje ekspresije COX-2 mRNA nije moguće tačno kvantifikovati jer u monocitima nema ekspresije COX-2 mRNA

S obzirom da su standardi polifenolnih jedinjenja rastvoreni u DMSO, na *Histogramu 6.2* prikazazani su rezultati ekspresije mRNA za enzime cPLA₂α, COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2, cPGES i TXAS u monocitima u prisustvu 1 μL DMSO, nakon izazivanja inflamacije dodatkom LPS-a u prisustvu 1 μL DMSO. Kao i na prethodnom *Histogramu 6.1.*, iako je evidentno da dolazi do ekspresije COX-2, ova promena nije mogla tačno da se kvantifikuje.



Histogram 6.2. Ekspresija mRNA ispitivanih enzima[‡] u nestimulisanim i LPS-stimulisanim monocitima u prisustvu DMSO

*statistički značajno različito od kontrole ($p \leq 0.05$), [‡]povećanje ekspresije COX-2 mRNA nije moguće kvantifikovati jer u monocitima nema ekspresije COX-2 mRNA

Prilikom prikazivanja rezultata narednih eksperimenata, u kojima je ispitivan modulatorni efekat ekstrakata, polifenolnih jedinjenja i drugih prirodnih ili sintetskih proizvoda na ekspresiju mRNK enzima uključenih u produkciju PGE₂ i TXA₂, monociti tretirani sa LPS u prisustvu ili odsustvu DMSO će predstavljati kontrolu u odnosu na koju će se određivati modulatorni efekat ispitivanih uzoraka.

Nakon odabira uslova u kojima će se pratiti uticaj ispitivanih prirodnih proizvoda i biljnih ekstrakata na ekspresiju mRNK enzima uključenih u produkciju PGE₂ i TXA₂, analizirano je nekoliko različitih eksperimentalnih uslova kako bi se odabrao najbolji za praćenje uticaja na produkciju PGE₂ i TXA₂.

PGE₂ i TXA₂ detektovani su primenom specifične i visokoselektivne HPLC-MS/MS tehnike uz korišćenje PGB₂ kao internog standarda. Korišćen je MRM mod (*multiple reaction monitoring*) koji omogućava simultanu kvantitaciju više različitih jedinjenja. S obzirom da su PGE₂ i TXA₂ metaboliti arahidonske kiseline koji su praćeni i u eksperimentima na trombocitima, optimalni parametri HPLC-MS/MS sistema za njihovo praćenje su prethodno određeni (Beara i sar., 2010; Lesjak i sar., 2013). U odnosu na prikazane metode, zbog promenjenih performansi aparata, parametri koji su promenjeni su protok mobilne faze (smanjen je sa 1 mL/min na 0.2 mL/min) i količina sirćetne kiseline u mobilnoj fazi (0.1% umesto 0.6%).

Kao što je ranije navedeno, monociti kojima je dodata arahidonska kiselina mogu da se koriste za praćenje produkcije PGE₂ i TXA₂ koji potiču samo od COX-1. U probama 1–4 (*Tabela 6.5.*) varirane su koncentracije arahidonske kiseline i vreme inkubacije. Utvrđeno je da je povećanje koncentracije arahidonske kiseline sa 5 na 10 µmol/L praćeno povećanom produkcijom TXA₂, dok na produkciju PGE₂ veći efekat ima vreme inkubiranja nego koncentracija dodate arahidonske kiseline. S obzirom da je u *Tabeli 6.3.* pokazano da nakon 15 minuta dolazi do ekspresije COX-2 mRNK, moguće je da je inicirana i ekspresija COX-2 proteina, usled čega je povećana i produkcija PGE₂. Zato su za analiziranje potencijalnog modulatornog efekta na COX-1, U937 monociti inkubirani 10 minuta u prisustvu 10 µmol/L arahidonske kiseline (metoda koja je u radu Wong i sar., 1997 korišćena za ispitivanje selektivne inhibicije COX-1). Nakon inkubacije reakcija je stopirana dodatkom 400 µL mravlje kiseline čime je pH reakcione smeše podešen na 3, a zatim je dodat interni standard PGB₂.

Upotrebom ovog model sistema može da se prati uticaj biljnih ekstrakata i čistih prirodnih proizvoda na produkciju PGE₂ i TXA₂ tokom homeostaze. Sa druge strane, nakon dodatka LPS povećava se ekspresija proinflamatornih enzima, prvenstveno COX-2 (*Tabela 6.3 i 6.4.*). Ovaj model sistem može da se koristi za ispitivanje sposobnosti uzoraka da inhibiraju produkciju PGE₂ i TXA₂ u monocitima tokom procesa inflamacije, kada su stimulisani monociti u krvi (monociti koji nisu na mestu inflamacije tj. nisu transformisani u makrofage u tkivu gde se odvija inflamatorni proces). Za nastajanje proizvoda ciklooksigenaznog puta u ovom slučaju odgovorne su i COX-1 i COX-2.

Nakon indukcije inflamacije, supstrat enzima ciklooksigenaznog puta može da bude arahidonska kiselina egzogenog ili endogenog porekla. Endogena arahidonska kiselina se oslobađa delovanjem cPLA₂α nakon dodatka kalicijumove jonofore (A23187). Kao što je prethodno navedeno, u radu Demasi i saradnika (2000) su, nakon aktivacije, LPS tretirani monociti inkubirani u prisustvu arahidonske kiseline (10 µmol/L, 15 minuta) ili

kalcijumove jonofore (1 $\mu\text{mol/L}$, 15 minuta). Prvi korak optimizacije uslova za praćenje produkcije PGE_2 i TXA_2 u U937 monocitima je bilo ispitivanje navedenih eksperimentalnih uslova. Uslovi koji su analizirani u U937 ćelijama u kojima je indukovana inflamacija prikazani su u *Tabeli 6.5.*, probe od 5 do 13.

Tabela 6.5. Optimizacija uslova za praćenje produkcije* PGE₂ i TXB₂ u U937 monocitima[†] tretiranim sa LPS, arahidonskom kiselinom ili A23187

Proba	Broj ćelija/mL	Aktivator I	Koncentracija aktivatora I	Vreme inkubacije sa aktivatorom I	Aktivator II	Koncentracija aktivatora II	Vreme inkubacije sa aktivatorom II	PGE ₂ /PGB ₂		TXB ₂ /PGB ₂	
								Proba [§] (tretirani monociti)	Kontrola (monociti netretirani aktivaatorom II)	Proba (tretirani monociti)	Kontrola (monociti netretirani aktivaatorom II)
1	1 × 10 ⁶	/	/	2 h	Arahidonska k.	5 μmol/L	10 minuta	0.06 ± 0.03 ^a	0.01 ± 0.00 ^a	0.02 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
2	1 × 10 ⁶	/	/	2 h	Arahidonska k.	10 μmol/L	10 minuta	0.09 ± 0.03 ^b	0.01 ± 0.01 ^a	0.09 ± 0.04 ^b	0.04 ± 0.03 ^a
3	1 × 10 ⁶	/	/	2 h [#]	Arahidonska k.	10 μmol/L	10 minuta	0.08 ± 0.01 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.07 ± 0.02 ^b	0.04 ± 0.01 ^a
4	1 × 10 ⁶	/	/	2 h	Arahidonska k.	10 μmol/L	15 minuta	0.17 ± 0.03 ^b	0.06 ± 0.02 ^a	0.06 ± 0.01 ^b	0.01 ± 0.01 ^a
5	1 × 10 ⁶	LPS	200 ng/mL	16 h [‡]	A23187	1 μmol/L	15 minuta	0.06 ± 0.02 ^a	0.05 ± 0.02 ^a	0.02 ± 0.00 ^a	0.01 ± 0.00 ^a
6	2 × 10 ⁶	LPS	200 ng/mL	16 h [‡]	A23187	1 μmol/L	15 minuta	0.09 ± 0.03 ^a	0.05 ± 0.04 ^a	0.03 ± 0.01 ^a	0.01 ± 0.00 ^a
7	1 × 10 ⁶	LPS	500 ng/mL	20 h [‡]	A23187	1 μmol/L	15 minuta	0.07 ± 0.00 ^a	0.05 ± 0.02 ^a	0.02 ± 0.00 ^b	0.01 ± 0.00 ^a
8	1 × 10 ⁶	LPS	500 ng/mL	20 h	Arahidonska k.	2.5 μmol/L	10 minuta	0.01 ± 0.00 ^a	0.01 ± 0.00 ^a	0.05 ± 0.01 ^b	0.01 ± 0.00 ^a
9	1 × 10 ⁶	LPS	500 ng/mL	20 h	Arahidonska k.	10 μmol/L	10 minuta	0.37 ± 0.05 ^b	0.01 ± 0.00 ^a	0.02 ± 0.00 ^a	0.01 ± 0.00 ^a
10	1 × 10 ⁶	LPS	500 ng/mL	20 h [‡]	Arahidonska k. [‡]	10 μmol/L	10 minuta	0.42 ± 0.09 ^b	0.02 ± 0.00 ^a	0.18 ± 0.02 ^b	0.01 ± 0.00 ^a
11	1 × 10 ⁶	LPS	500 ng/mL	20 h [‡]	Arahidonska k.	10 μmol/L	15 minuta	0.23 ± 0.02 ^b	0.06 ± 0.01 ^a	0.04 ± 0.01 ^b	0.01 ± 0.00 ^a
12	1 × 10 ⁶	LPS	500 ng/mL	20 h	Arahidonska k.	10 μmol/L	45 minuta	0.35 ± 0.04 ^b	0.01 ± 0.00 ^a	0.05 ± 0.01 ^a	0.01 ± 0.00 ^a
13	1 × 10 ⁶	LPS	500 ng/mL	20 h [#]	Arahidonska k.	10 μmol/L	45 minuta	0.10 ± 0.01 ^b	0.01 ± 0.00 ^a	0.04 ± 0.01 ^a	0.01 ± 0.00 ^a

*srednja vrednost bar 3 ponavljanja; [‡]Eksperimenti su rađeni u RPMI-1640 medijumu, koji je sadržao 2.05 mmol/L L-glutamina, 25.0 mmol/L HEPES, 100 U/mL penicilina, 0.10 mg/mL streptomocina i 0.25 μg/mL amfotericina B, a nije sadržao FBS; [‡]Eksperimenti su rađeni u RPMI-1640 medijumu, koji je sadržao 2.05 mmol/L L-glutamina, 25.0 mmol/L HEPES, 100 U/mL penicilina, 0.10 mg/mL streptomocina, 0.25 μg/mL amfotericina B, i 10% FBS; [§]Različita slova (a-b) u eksponentu u istom redu tabele ukazuju na statistički značajnu razliku od kontrole, pri nivou značajnosti od ≤ 0.05 (na osnovu t-testa); [#]Eksperimenti u prisustvu DMSO.

Kao što je prikazano u *Tabeli 6.5.*, u probama 5–7, nije zabeležena povećana produkcija PGE₂ i TXA₂ dodatkom 1 µmol/L kalcimicina i inkubacije tokom 15 minuta. Koncentracija LPS kojim su stimulisane ćelije ili broj ćelija nisu značajno uticale na potencijal kalcimicina da stimuliše oslobađanje arahidonske kiseline iz fosfolipidnog dvosloja.

Korišćenjem egzogene arahidonske kiseline kao supstrata, uočava se povećana produkcija i PGE₂ i TXA₂. Kako bi eksperimentalni uslovi bili što sličniji onima u kojima se prati uticaj na ekspresiju mRNA enzima uključenih u produkciju PGE₂ i TXA₂, vreme inkubacije i koncentracija LPS su bili konstantni (20 h, 500 ng/mL). Može se zapaziti da je nakon dodatka 2.5 µmol/L arahidonske kiseline više povećana produkcija TXA₂ nego PGE₂, dok arahidonska kiselina pri koncentraciji 10 µmol/L više povećava produkciju PGE₂. S obzirom da se ovaj model sistem koristi za praćenje aktivnosti i mRNA oba COX enzima, i da je COX-2 povećana delovanjem LPS, duža inkubacija ćelija sa arahidonskom kiselinom, koja bi potencijalno indukovala dodatnu ekspresiju COX-2, ne predstavlja problem. Zato su za dalja istraživanja odabrane probe 12 i 13, u kojim se arahidonska kiselina inkubira 45 minuta sa ćelijama. Na osnovu priložene *Tabele 6.5.*, može se uočiti da ukoliko se eksperiment izvodi u RPMI 1640 medijum uz dodatak 10% FBS, količina produkovanog metabolita, prvenstveno TXA₂, je znatno povećana (proba 10), međutim zbog ranije navedenih razloga, odlučeno je da se eksperimenti izvode u medijumu bez FBS.

Pengalis i saradnici (2000) su pratili kinetiku produkciju PGE₂ i TXA₂ u primarnim monocitima i U937 monocitima. Rezultati navedenog istraživanja pokazali su da se pri nižim koncentracijama arahidonske kiseline proizvodi prvenstveno TXA₂, i da se pri koncentraciji arahidonske kiseline od 5 µmol/L postiže konstantna brzina produkcije TXA₂. Sa druge strane, produkcija PGE₂ se povećava sa porastom koncentracija od 5 µmol/L do 25 µmol/L. Takođe, uočili su da se koncentracije produkovanog TXA₂ ne razlikuju između LPS tretiranih i netretiranih monocita, dok se koncentracija PGE₂ povećava približno dva puta. Slični zaključci se mogu izvesti i na osnovu rezultata prikazanih u *Tabeli 6.5.* Takođe, pri odabranim eksperimentalnim uslovima više je povećana produkcija PGE₂ (približno 9 puta) nego TXA₂ (2 puta).

U nekoliko radova (Demasi i sar., 2000; Kato i sar., 2001) su monociti pre indukcije inflamacije LPS-om tretirani aspirinom, u cilju inhibicije COX-1, a navedeni sistem se upotrebljavao za određivanje selektivne inhibicije COX-2. Međutim, u okviru naših istraživanja, nije postignuta potpuna inhibicija COX-1 dodatkom aspirina ili selektivnog inhibitora COX-1, SC-560, usled čega nije bilo moguće analizirati selektivnost ka COX-1/2.

Imuni odgovor organizma na spoljni patogen uključuje transport monocita do mesta inflamacije gde se oni transformišu u makrofage i aktivno učestvuju u inflamatornom odgovoru. U makrofagama dolazi do ekspresije COX-2, koja je dodatno snažno povećana dejstvom inflamatornih agenasa i rezultuje povećanom produkcijom PGE₂ i TXA₂. Ključne faze nastajanja ovih proizvoda uključuju dominantno dejstvo COX-2, uz manji doprinos COX-1, a ovaj model sistem može da se koristi za ispitivanje sposobnosti uzoraka da inhibiraju inflamaciju tokom kasnijih faza inflamatornog odgovora, kada su

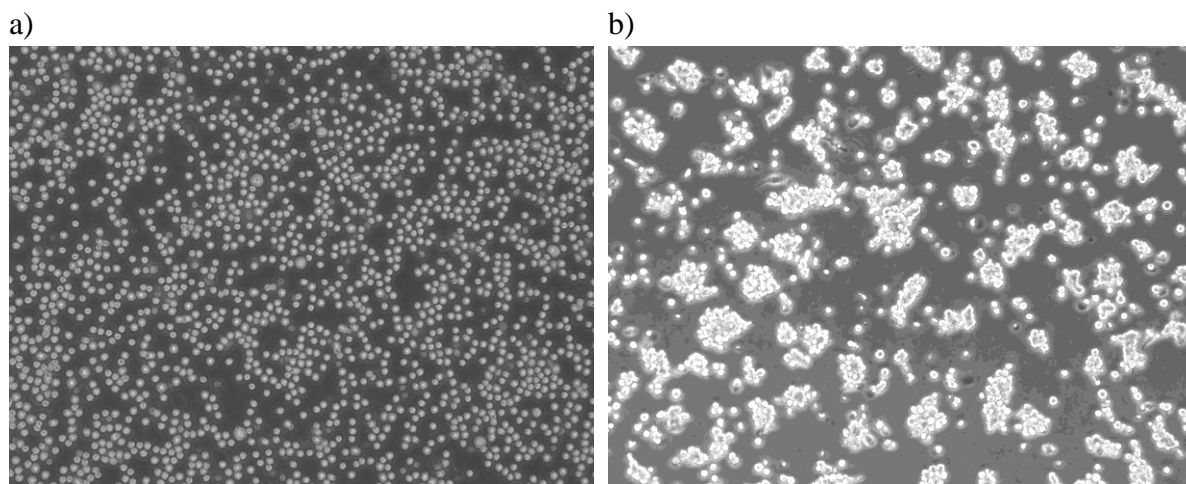
monociti već transformisani u makrofage na mestima gde se ovi procesi inflamacije odvijaju.

Najčešći stimuli koji se u *in vitro* uslovima koriste za diferencijaciju monocita u makrofage su PMA, derivati vitamina D, retinoinska kiselina, interferon ili različiti citokini (Garrelds i sar., 1999; Valdés López i Urcuqui-Inchima, 2018). U okviru ovog rada, monociti su diferencirani do makrofaga delovanjem PMA, a inflamacija je izazvana dodatkom LPS, čime je uslovljen proinflamatorni, M1 fenotip makrofaga.

Iako je PMA jedan od najčešće korišćenih agenasa pomoću kog se monociti diferenciraju u makrofage, koncentracije PMA i vreme inkubacije se razlikuju. Na primer, Bienkowski i saradnici (1988) su 2×10^5 ćelija/mL tretirali PMA (100 nmol/L) tokom 48 sati, a zatim ostavljali preko noći u medijumu bez PMA. Rioux i Castonguay (2000) su 1×10^6 ćelija/mL inkubirali tokom tri dana u medijumu koji je sadržao 10 nmol/L PMA, a zatim još 6 sati u medijumu bez PMA. Jiang i saradnici (2003a) su diferencirali monocite do makrofaga tako što su 7×10^5 ćelija/mL u medijumu bez FBS koji sadrži 0.1% albumina goveđeg seruma (BSA) inkubirali tokom 48 sati u prisustvu PMA (160 nmol/L); Ivanov i saradnici (2008) su inkubirali 1×10^6 ćelija/mL u medijumu za gajenje ćelija koji sadrži 40 nmol/L PMA tokom 48 sati, zatim je medijum zamenjen novim medijumom (0.1% BSA/RPMI 1640 uz dodatak 40 nmol/L PMA) i ćelije su inkubirane još 24 sata. Overman i saradnici (2010) su inkubirali 0.75×10^6 ćelija/mL u medijumu za gajenje ćelija (10% FBS, 60 U/mL penicilina, 60 U/L streptomocina, 25 µg/mL amfotericina B) uz dodatak 48.5 nmol/L PMA tokom 24 sata, zatim je medijum zamenjen svežim medijumom bez PMA i ćelije su inkubirane još 24 sata.

Usled dostupnosti velikog broja metoda, tokom odabira najpogodnije metode za diferencijaciju monocita do makrofaga analizirano je nekoliko različitih eksperimentalnih uslova. Uočeno je da ukoliko se PMA doda u medijum bez FBS ne dolazi do transformacije monocita u makrofage (rezultati nisu prikazani, ćelije izgledaju identično kao monociti). Sa druge strane, ukoliko diferencijacija izvodi u kompletnom medijumu (koji sadrži i 10% FBS), dolazi do diferencijacije monocita do makrofaga.

Tokom diferencijacije do makrofaga, monociti prolaze kroz niz morfoloških promena, od kojih pojava adherentnosti predstavlja osnovni pokazatelj da su monociti sazreli u makrofage (*Slika 6.2.*). Dok su monociti odvojene ćelije u suspenziji, makrofage se međusobno grupišu u grozdove i lepe za dno suda. Promena morfoloških karakteristika je u našim istraživanjima bila faktor indikacije da li je diferencijacija monocita do makrofaga bila uspešna.



Slika 6.2. U937 monociti (a) i U937 makrofage, 72 sata u potpunom medijumu uz dodatak PMA(b)

Slikano pod mikroskopom pomoću Leica Microsystems, Camera= DFC290 HD; Microscope= DMIL;

Smatra se da su promene morfoloških karakteristika praćene promenama funkcionalnih karakteristika, zbog čega U937 makrofage mogu da se smatraju različitim model sistemom u odnosu na U937 monocite. Promena morfoloških karakteristika monocita uočava se već posle 24 sata. Pošto je cilj ove disertacije bilo proučavanje uticaja polifenolnih jedinjenja na produkciju PGE₂ i TXA₂ u inflamaciji, prilikom odabira odgovarajućih eksperimentalnih uslova, diferencirane makrofage su stimulirane i LPS-om u cilju transformacije do proinflamatornog M1 fenotipa. S obzirom da su na monocitima odabrani uslovi, cilj je bio da se na makrofagama optimizuje metoda u kojoj će biti primenjeni što sličniji uslovi, kako bi poređenje aktivnosti između ova dva model sistema bilo moguće, odnosno zavisilo jedino od stadijuma diferencijacije ćelije. Za transformaciju monocita u makrofage odabrana je koncentracija PMA od 100 nmol/L, pri čemu je varirano vreme inkubacije sa PMA i broj ćelija. Inflamacija je indukovana dodatkom LPS koncentracije 500 ng/mL, kao supstrat korišćena je egzogena arahidonska kiselina (10 μmol/L).

U Tabeli 6.6. prikazano je kako se menja ekspresija zajedničkih enzima produkcije PGE₂ i TXA₂ usled tretmana sa PMA i LPS. Odgovora makrofaga na stimulaciju LPS-om rezultuje povećanom ekspresijom cPLA₂α COX-2. Međutim, intenzitet datog odgovora se veoma razlikuje. Uočava se da je odgovor mnogo slabiji ukoliko se ćelije inkubiraju samo tokom 48 sati u prisustvu PMA (proba 1 i 2) u odnosu na odgovor koji se dobija ukoliko se ćelije inkubiraju 48 sati u medijumu sa PMA, pa ostave još 24 sata nakon transformacije u potpunom medijumu za gajenje ćelija. Takođe, na osnovu priložene Tabele 6.6., može se zaključiti i da broj ćelija, koji je svakako uvek isti u probama i kontrolama, nije presudan za intenzitet datog odgovora.

Tabela 6.6. Optimizacija uslova za praćenje uticaja na ekspresiju* cPLA₂α i COX-1/2 mRNK u U937 makrofagama[‡]

Proba	Broj ćelija/mL	Inkubacija u prisustvu 100 nmol/L PMA [‡]	Inkubacija nakon transformacije u svežem medijumu	Inkubacija u prisustvu 500 ng/mL LPS	Ekspresija cPLA ₂ α (normalizovane vrednosti ekspresije: cPLA ₂ α mRNK/GAPDH mRNK)		Ekspresija COX-1 (normalizovane vrednosti ekspresije: COX-1 mRNK/GAPDH mRNK)		Ekspresija COX-2 (normalizovane vrednosti ekspresije: COX-2 mRNK/GAPDH mRNK)	
					Proba § (tretirane makrofage)	Kontrola (netretirane makrofage)	Proba (tretirane makrofage)	Kontrola (netretirane makrofage)	Proba (tretirane makrofage)	Kontrola (netretirane makrofage)
1	0.5 × 10 ⁶	48 h	0 h	20 h	1.50 ± 0.35 ^a	1.00 ± 0.05 ^a	0.56 ± 0.22 ^a	1.00 ± 0.05 ^a	2.05 ± 0.10 ^b	1.00 ± 0.05 ^a
2	1 × 10 ⁶	48h	0 h	20 h	1.46 ± 0.12 ^b	1.00 ± 0.10 ^a	0.83 ± 0.19 ^a	1.00 ± 0.03 ^a	2.89 ± 0.52 ^b	1.00 ± 0.20 ^a
3	0.5 × 10 ⁶	48 h	24 h	24 h	1.71 ± 0.59 ^a	1.00 ± 0.22 ^a	0.27 ± 0.04 ^a	1.00 ± 0.26 ^a	38.2 ± 4.37 ^b	1.00 ± 0.27 ^a
4	1 × 10 ⁶	48 h	24 h	24 h	2.91 ± 1.13 ^a	1.00 ± 0.31 ^a	0.79 ± 0.12 ^a	1.00 ± 0.16 ^a	102 ± 17.0 ^b	1.00 ± 0.14 ^a
5	0.5 × 10 ⁶	72 h	0 h	20 h	2.22 ± 0.03 ^a	1.00 ± 0.56 ^a	1.20 ± 0.44 ^a	1.00 ± 0.20 ^a	12.0 ± 4.73 ^b	1.00 ± 0.57 ^a
6	1 × 10 ⁶	72 h	0 h	20 h	3.26 ± 0.27 ^b	1.00 ± 0.14 ^a	0.86 ± 0.20 ^a	1.00 ± 0.21 ^a	14.9 ± 3.79 ^b	1.00 ± 0.22 ^a
7	1 × 10 ⁶	72 h	0 h	24 h	4.97 ± 0.65 ^b	1.00 ± 0.11 ^a	0.49 ± 0.09 ^b	1.00 ± 0.09 ^a	54.5 ± 14.8 ^b	1.00 ± 0.17 ^a
8	1 × 10 ⁶	72 h	2 h	16 h	3.83 ± 0.97 ^b	1.00 ± 0.02 ^a	0.80 ± 0.07 ^a	1.00 ± 0.22 ^a	9.38 ± 3.25 ^b	1.00 ± 0.60 ^a
9	1 × 10 ⁶	72 h	2 h	20 h	6.38 ± 1.05 ^b	1.00 ± 0.23 ^a	0.77 ± 0.34 ^a	1.00 ± 0.20 ^a	10.4 ± 1.67 ^b	1.00 ± 0.25 ^a

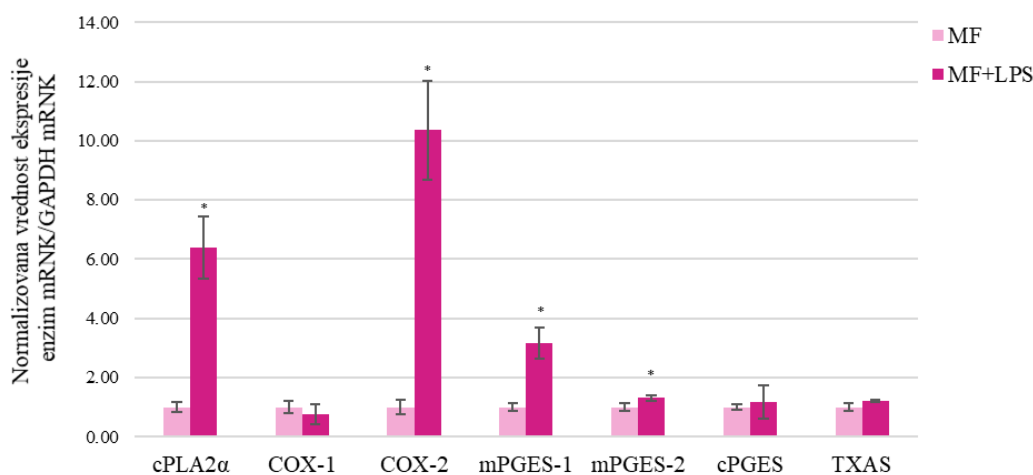
*srednja vrednost bar 3 ponavljanja; [‡]Inkubacija sa PMA je u RPMI-1640 medijumu, koji je sadržao 2.05 mmol/L L-glutamina, 25.0 mmol/L HEPES, 100 U/mL penicilina, 0.10 mg/mL streptomicina i 0.25 µg/mL amfotericina B i 10% FBS, dok je pre dodatka LPS medijum zamenjen medijumom bez FBS; [§]Različita slova (a-b) u eksponentu u istom redu tabele ukazuju na statistički značajnu razliku od kontrole, pri nivou značajnosti od ≤ 0.05 (na osnovu t-testa).

Tabela 6.7. Optimizacija uslova za praćenje uticaja na ekspresiju* mPGES-1, mPGES-2 i TXAS mRNK u U937 makrofagama[‡]

Proba	Broj ćelija/mL	Inkubacija u prisustvu 100 nmol/L PMA [‡]	Inkubacija nakon transformacije, u svežem medijumu	Inkubacija (u prisustvu 500 ng/mL LPS)	Ekspresija mPGES-1 (normalizovane vrednosti ekspresije: mPGES-1 mRNK/GAPDH mRNK)*		Ekspresija mPGES-2 (normalizovane vrednosti ekspresije: mPGES-2 mRNK/GAPDH mRNK)		Ekspresija TXAS (normalizovane vrednosti ekspresije: TXAS mRNK/GAPDH mRNK)	
					Proba (tretirane makrofage)	Kontrola (netretirane makrofage)	Proba (tretirane makrofage)	Kontrola (netretirane makrofage)	Proba (tretirane makrofage)	Kontrola (netretirane makrofage)
9	1 × 10 ⁶	72 h	2h	20 h	3.15 ± 0.52 ^b	1.00 ± 0.13 ^a	1.31 ± 0.10 ^b	1.00 ± 0.12 ^a	1.21 ± 0.02 ^a	1.00 ± 0.12 ^a

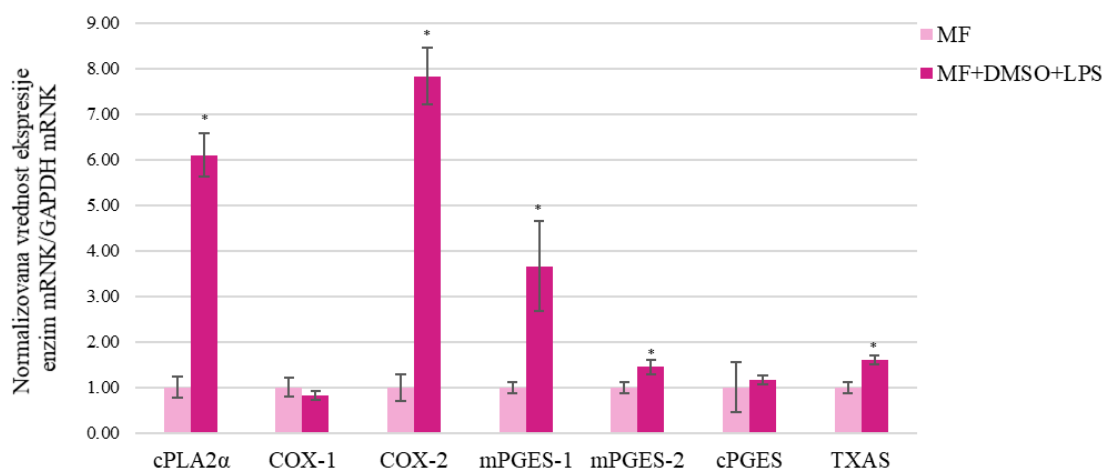
*srednja vrednost bar 3 ponavljanja; [‡]Inkubacija sa PMA je u RPMI-1640 medijumu, koji je sadržao 2.05 mmol/L L-glutamina, 25.0 mmol/L HEPES, 100 U/mL penicilina, 0.10 mg/mL streptomicina i 0.25 µg/mL amfotericina B i 10% FBS, dok je pre dodatka LPS medijum zamenjen medijumom bez FBS; [§]Različita slova (a-b) u eksponentu u istom redu tabele ukazuju na statistički značajnu razliku od kontrole, pri nivou značajnosti od ≤ 0.05 (na osnovu t-testa).

Uslovi koji su na osnovu *Tabele 6.6.* odabrani kao optimalni su oni koji su primenjeni u probi 9: inkubacija 72 sata u prisustvu PMA u potpunom medijumu (RPMI-1640, koji je sadržao 2.05 mmol/L L-glutamina, 25.0 mmol/L HEPES, 100 U/mL penicilina, 0.10 mg/mL streptomicina i 0.25 µg/mL amfotericina B i 10% FBS), inkubacija 2 sata (obično u prisustvu jedinjenja čiji se potencijal analizira) i indukcija inflamacije LPS-om tokom 20 sati u medijumu bez FBS. Na osnovu *Tabele 6.7.* uočava se da pri istim uslovima povećana i ekspresija mPGES-1 mRNK, enzima koji je pored COX-2 odgovoran za produkciju PGE₂ u inflamaciji, kao i ekspresija mPGES-2 mRNK, ali znatno manje. Promena ekspresija mRNK svih enzima uključenih u produkciju PGE₂ i TXA₂ u izabranom model sistemu prikazana je na *Histogramu 6.3*, dok je na *Histogramu 6.4* prikazana promena ekspresije mRNK svih enzima u prisustvu DMSO. U narednim eksperimentima će kontrolu predstavljati makrofage tretirane LPS ili LPS u prisustvu DMSO, u zavisnosti od toga u kom su rastvaraču uzorci pripremljeni.



Histogram 6.3. Ekspresija mRNK ispitivanih enzima u nestimulisanim i LPS-stimulisanim makrofagama

* statistički značajno različito od kontrole ($p \leq 0.05$);



Histogram 6.4. Ekspresija mRNK ispitivanih enzima u nestimulisanim i LPS-stimulisanim makrofagama u prisustvu DMSO

* statistički značajno različito od kontrole ($p \leq 0.05$);

Na osnovu priloženih *Histograma 6.3.* i *6.4.* uočava se da u prikazanom model sistemu, ekvivalentno bez DMSO ili u prisustvu DMSO, dolazi do promene ekspresije cPLA₂ α , COX-2, mPGES-1 i mPGES-2 mRNK, dok u prisutvu DMSO dolazi i do blagog povećanja TXAS mRNK. Kao i u prethodnom model sistemu na monocitima, u narednim eksperimentima biće praćen uticaj na ekspresiju mRNK svih enzima, jer svi doprinose krajnjoj količini produkovanog PGE₂ i TXA₂.

Takođe, analiziran je uticaj inflamatornog agensa, LPS, na produkciju PGE₂ i TXA₂ u makrofagama (*Tabela 6.8.*). Uočava se da i sama indukcija inflamacije LPS-om, bez dodatka arahidonske kiseline kao supstrata povećava produkciju PGE₂ i TXA₂.

Pri dodatku arahidonske kiseline, produkcija ovih lipidnih medijatora je znatno povećana, a uočava se da makrofage daju jači odgovor u odnosu na LPS-stimulisane monocite. Iako ne najjači, nakon inkubacije od 45 minuta u prisustvu arahidonske kiseline dobija se dobar odgovor, pa je ovaj model izabran za dalje eksperimente, kako bi uslovi bili isti kao i u sistemu sa LPS-stimulisanim monocitima.

Tabela 6.8. Optimizacija uslova za praćenje produkcije* PGE₂ i TXB₂ u U937 makrofagama tretiranim sa LPS

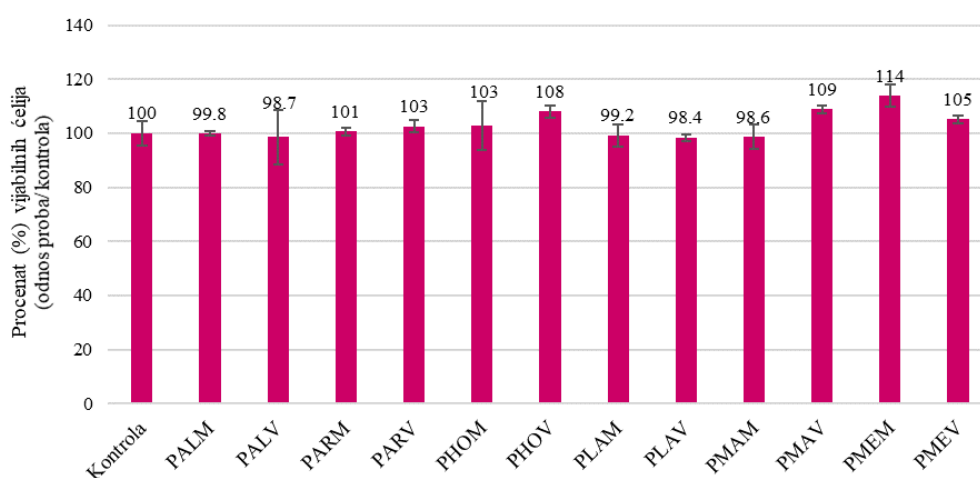
Proba	Broj ćelija/mL	Inkubacija u prisustvu 100 nmol/L PMA [‡]	Inkubacija u prisustvu 500 ng/mL LPS	Inkubacija u prisustvu supstrata (arahidonska kiselina 10 μmol/L)	PGE ₂ /PGB ₂		TXB ₂ /PGB ₂	
					Proba [§] (tretirane makrofage)	Kontrola (netretirane makrofage (1-2)/ makrofage +LPS (3-7))	Proba (tretirane makrofage)	Kontrola (netretirane makrofage (1-2)/ makrofage +LPS (3-7))
1	1 × 10 ⁶	72 h	20 h	/	0.08 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.02 ^a	0.07 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
2	1 × 10 ⁶	72 h [¥]	20 h [¥]	/	0.14 ± 0.05 ^a	0.06 ± 0.03 ^a	0.05 ± 0.02 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
3	1 × 10 ⁶	72 h	20 h	20 minuta	0.18 ± 0.05 ^b	0.05 ± 0.01 ^a	0.06 ± 0.02 ^b	0.01 ± 0.01 ^a
4	1 × 10 ⁶	72 h [¥]	20 h [¥]	20 minuta	0.33 ± 0.07 ^b	0.06 ± 0.01 ^a	0.18 ± 0.01 ^b	0.00 ± 0.00 ^a
5	1 × 10 ⁶	72 h	20 h [¥]	30 minuta	0.40 ± 0.06 ^b	0.03 ± 0.00 ^a	0.15 ± 0.01 ^b	0.01 ± 0.00 ^a
6	1 × 10 ⁶	72 h	20 h	30 minuta	0.81 ± 0.06 ^b	0.01 ± 0.00 ^a	0.03 ± 0.00 ^a	0.01 ± 0.00 ^a
7	1 × 10 ⁶	72 h	20 h [#]	45 minuta	0.53 ± 0.11 ^b	0.01 ± 0.00 ^a	0.13 ± 0.00 ^b	0.03 ± 0.01 ^a

*srednja vrednost bar 3 ponavljanja; [‡]Inkubacija sa PMA je u RPMI-1640 medijumu, koji je sadržao 2.05 mmol/L L-glutamina, 25.0 mmol/L HEPES, 100 U/mL penicilina, 0.10 mg/mL streptomocina i 0.25 μg/mL amfotericina B i 10% FBS, dok je pre dodatka LPS medijum zamenjen medijumom bez FBS; [¥] Inkubacija sa PMA je u RPMI-1640 medijumu, koji je sadržao 2.05 mmol/L L-glutamina, 25.0 mmol/L HEPES, 100 U/mL penicilina, 0.10 mg/mL streptomocina i 0.25 μg/mL amfotericina B i 10% FBS, dok je pre dodatka LPS medijum zamenjen istim medijumom (sa 10% FBS); [§]Različita slova (a-b) u eksponentu u istom redu tabele ukazuju na statistički značajnu razliku od kontrole, pri nivou značajnosti od ≤ 0.05 (na osnovu t-testa); [#]Eksperimenti u prisustvu DMSO;

6.2. Ispitivanje citotoksičnosti - odabir subtoksičnih koncentracija ispitivanih uzoraka

Pre analize uticaja odabranih uzoraka na produkciju PGE₂ i TXA₂, ispitan je potencijalni citotoksični efekat na U937 ćelijsku liniju metodom brojanja ćelija uz dodatak tripan plavog (Poglavlje 5.4.3.). Rezultati su predstavljeni kao procenat vijabilnih ćelija u radnim probama u odnosu na kontrolu, a ukoliko je procenat vijabilnih ćelija bio iznad 95% smatrano je da uzorci nisu toksični. Takođe, smatrano je da uzorci i pri koncentracijama nižim od one pri kojoj je potvrđeno netoksično delovanje nisu citotoksični. Određivanje subtoksičnih koncentracija analiziranih uzoraka je neophodno kako se ne bi dobili lažno pozitivni ili lažno negativni rezultati. Naime, gubitak ćelijskih funkcija i vijabilnosti rezultovao bi smanjenom produkcijom analiziranih metabolita, što bi pogrešno moglo da se tumači kao inhibitorski uticaj na metabolizam arahidonske kiseline. Sa druge strane, uočeno je da je tokom apoptoze povećana ekspresija COX-2, te bi se uzorci koji deluju toksično na odabranu ćelijsku liniju mogli, pogrešno, smatrati modulatorima ekspresije ovog enzima.

Ekstrakti bokvica su rastvoreni u vodi, te je usled netoksičnosti rastvarača, bilo moguće koristiti veće zapremine. Dodato je 5 µL ekstrakata bokvica koncentracije 200 mg/mL, pri čemu je radna koncentracija iznosila 500 µg/mL. Nije uočen citotoksičan efekat ekstrakata bokvica pri primenjenoj koncentraciji (Histogram 6.5.)



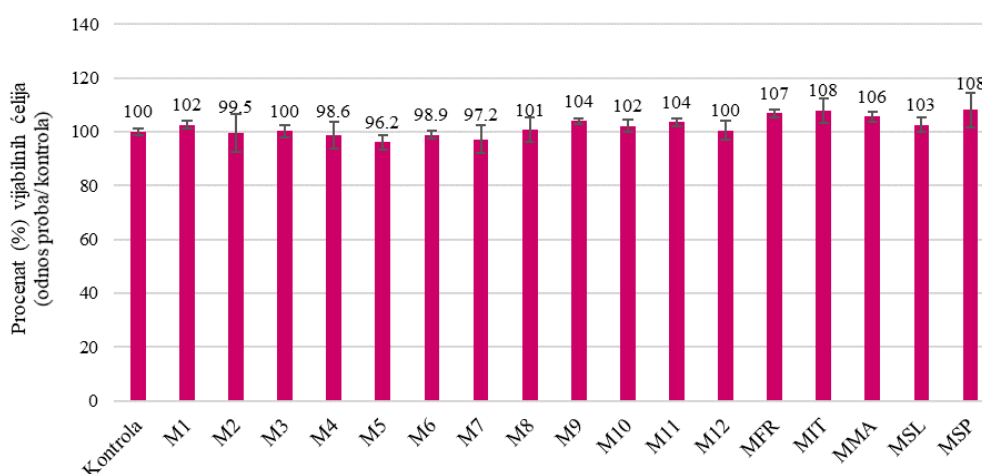
Histogram 6.5. Rezultati ispitivanja citotoksičnosti ekstrakata bokvica[‡]

Oznake: M - metanolni ekstrakt; V - vodeni ekstrakt; PAL - *P. altissima*; PAR - *P. argentea*; PHO - *P. holosteum*; PLA - *P. lanceolata*; PMA - *P. major*; PME - *P. media*; [‡] koncentracija ekstrakata 500 µg/mL

Uzorci vina su nakon uparavanja rastvoreni u DMSO do koncentracije 300 mg/mL. Takođe, sva pojedinačna polifenolna jedinjenja, iridoid (aukubin), triterpenska kiselina (ursolna kiselina), inhibitori ciklooksigenaza i sintetska jedinjenja su rastvorena u DMSO. Zbog toksičnog efekta DMSO na ćelije, maksimalna dodata zapremina svih navedenih uzoraka iznosila je 1 µL, pri čemu je sadržaj DMSO u reakcionoj smeši bio 0.05%. Vijabilnost ćelija je određivana nakon inkubacije (22 časa) sa uzorcima. S obzirom da je i arahidonska kiselina, koja se koristi kao supstrat enzima, takođe

rastvorena u DMSO, nakon dvadesetdvočasovne inkubacije sa uzorcima rastvorenim u DMSO, dodat je još 1 μL DMSO, tretirane ćelije su inkubirane sat vremena i ponovo je ispitana vijabilnost. Uočeno je da ovi eksperimentalni uslovi, odnosno dodatak još 1 μL DMSO i inkubacija u toku dodatnih sat vremena, ne utiču na vijabilnost ćelija (rezultati nisu prikazani). Takođe, ni LPS u koncentraciji primenjenoj u testovima nije uticao na vijabilnost ćelija.

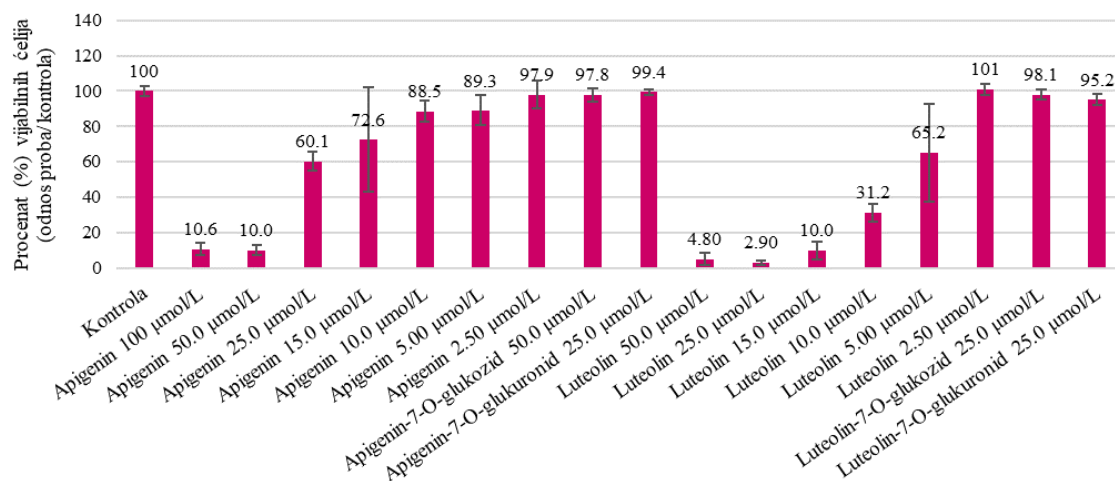
Ni jedan od analiziranih uzoraka vina nije ispoljio citotoksično delovanje pri koncentraciji od 150 $\mu\text{g/mL}$ (*Histogram 6.6.*), pa je ova koncentracija *Merlot* vina korišćena za dalje eksperimente.



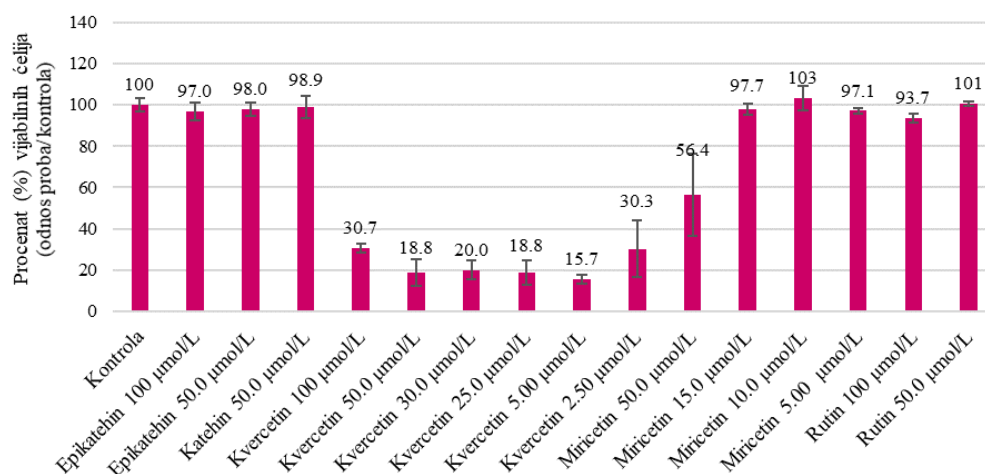
Histogram 6.6. Rezultati ispitivanja citotoksičnosti uzoraka Merlot vina[‡]

Oznake: M-1 do M-12 - *Merlot* vina iz Srbije; MFR - *Merlot* vino iz Francuske; MIT - *Merlot* vino iz Italije; MMA - *Merlot* vino iz Makedonije; MSL - *Merlot* vino iz Slovenije; MSP - *Merlot* vino iz Španije; [‡] koncentracija 150 $\mu\text{g/mL}$.

Jedan od planiranih ishoda ove teze bila je analiza uticaja odabranih polifenola na produkciju PGE_2 i TXA_2 , sa posebnim naglaskom na flavonoide iz klase flavona (apigenin, luteolin i njihovi derivati i metaboliti) i flavonola (kvercetin i njegovi derivati), čija citotoksičnost je prva ispitana. Inicijalna ideja je bila da se aktivnost polifenolnih jedinjenja ispita pri koncentraciji od 100 $\mu\text{mol/L}$. Međutim, rezultati su pokazali da kvercetin, apigenin, miricetin i luteolin ispoljavaju citotoksični potencijal pri ovim koncentracijama, pa su ispitane i niže koncentracije (*Histogram 6.7. i 6.8.*). Prva (najviša) koncentracija pri kojoj apigenin i luteolin nisu uticali na vijabilnost ćelija je 2.5 $\mu\text{mol/L}$, pa je upravo ona odabran za dalje testove. Kvercetin je i pri ovoj koncentraciji bio toksičan za ćelije, usled čega je isključen iz daljih ispitivanja, kao i njegovi derivati.



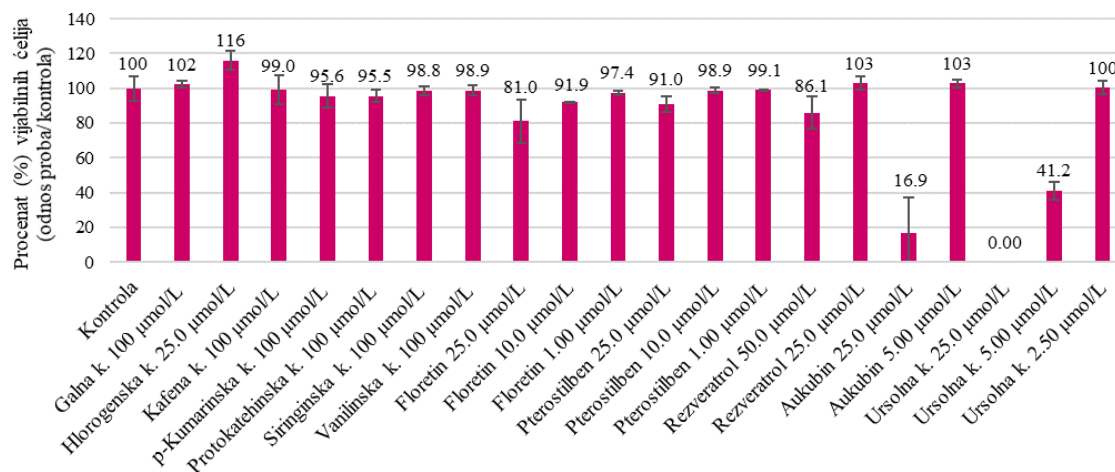
Histogram 6.7. Rezultati ispitivanja citotoksičnosti odabranih flavonoida - flavona



Histogram 6.8. Rezultati ispitivanja citotoksičnosti odabranih flavonoida - flavan-3-ola i flavonola

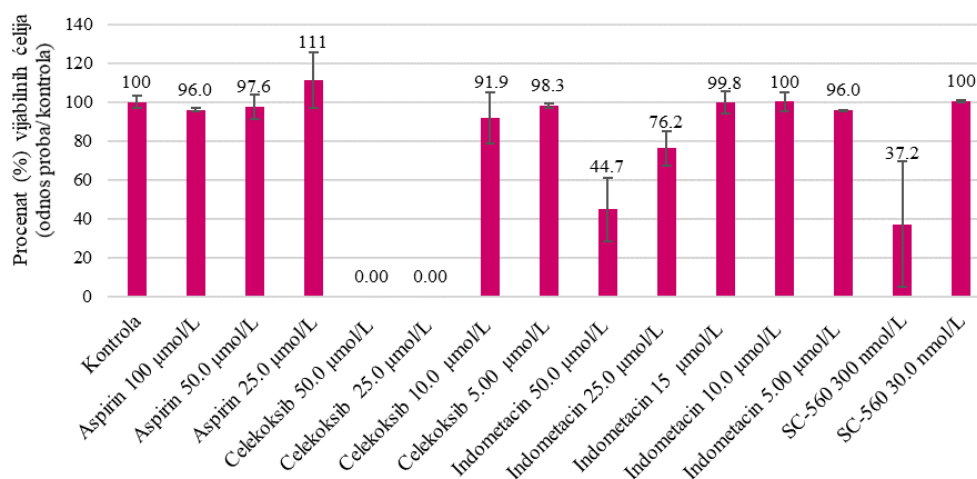
Analiza hemijskog sastava je pokazala da su u uzorcima *Merlot* vina i ekstraktima bokvica u visokim koncentracijama prisutne i neke druge klase polifenolnih jedinjenja (fenolne kiseline, stilbeni), ali i druga jedinjenja (iridoidi, triterpenske kiseline), koja mogu da doprinesu biološkoj aktivnosti. Nakon preliminarnih ispitivanja citotoksičnosti (Histogram 6.9.), analiziran je uticaj ovih standardnih jedinjenja na produkciju PGE₂ i TXA₂ pri koncentraciji od 2.5 µmol/L. U nekim model sistemima, aktivnost jedinjenja koja nisu ispoljila toksično delovanje ispitana je i pri koncentraciji od 25 µmol/L.

Dva jedinjenja čiji sadržaj nije određivan u navedenim ekstraktima bokvica i uzorcima vina, pterostilben i floretin, su analizirana kao modulatori metabolizma arahidonske kiseline u sklopu šireg ispitivanja njihovog biološkog potencijala. Citotoksični efekat i ovih jedinjenja je ispitan, a rezultati su prikazani na *Histogramu 6.9.*



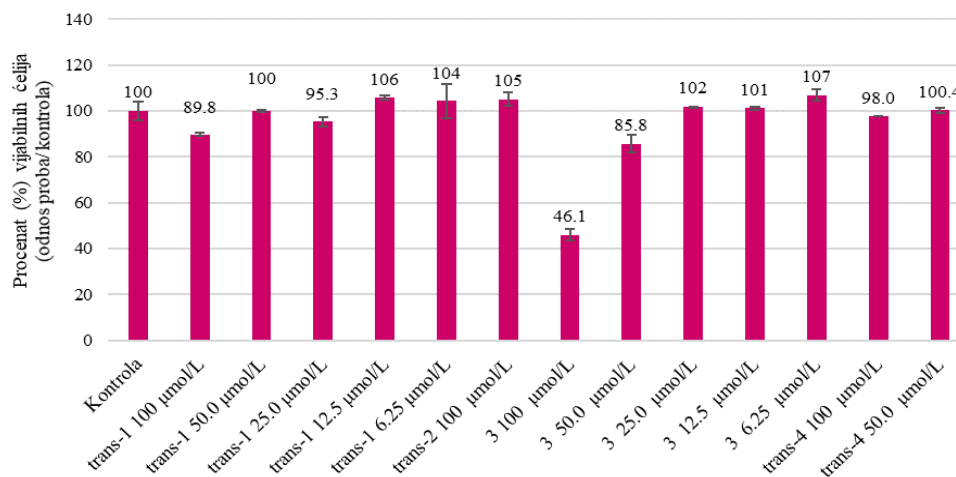
Histogram 6.9. Rezultati ispitivanja citotoksičnosti odabranih fenolnih kiselina dihidrohalkona,, stilbena, iridoida i triterpenske kiseline

Radi jasnije interpretacije rezultata, aktivnost polifenolnih jedinjenja poređena je sa aktivnošću standardnih inhibitora ciklooksigenaza, čiji je potencijal paralelno analiziran. Aspirin nije bio toksičan za ćelije, najveća koncentracija pri kojoj celekoksib i indometacin nisu ispoljili citotoksično delovanje je 5 µmol/L i 15 µmol/L, redom, dok je selektivni inhibitor SC-560 bio toksičan i u izuzetno niskim koncentracijama. Koncentracija SC-560 pri kojoj nije uočen efekat na vijabilnost ćelija iznosila je 30 nmol/L (*Histogram 6.10*).



Histogram 6.10. Rezultati ispitivanja citotoksičnosti COX-1/2 inhibitora

Jedan od ciljeva ove doktorske disertacije je bila i upotreba optimizovane metode za određivanje potencijala inhibicije produkcije PGE₂ i TXA₂ u U937 ćelijskoj liniji u ispitivanjima biološkog potencijala sintetskih jedinjenja. Rezultati citotoksičnog delovanja ovih jedinjenja prikazani su na *Histogramu 6.11*.



Histogram 6.11. Rezultati ispitivanja citotoksičnosti sintetskih jedinjenja

Na osnovu ovih rezultata, odabrane radne koncentracije sintetskih jedinjenja su bile: 50 µmol/L za *trans-1*, *trans-2* i *trans-4*, a 25 µmol/L za jedinjenje **3**.

6.3. Metanolni i vodeni ekstrakti bokvica kao modulatori produkcije PGE₂ i TXA₂

Bokvice su poznate i priznate kako u tradicionalnoj, tako i u zvaničnoj medicini različitih zemalja. Verovatno najpoznatije upotrebe su vrste *P. lanceolata* za ublažavanje kašlja, *P. major* za zarastanje rana i *P. asiatica* kao laksativ.

U Srbiji je prisutno 14 vrsta ovog roda koje su različito rasprostranjene u zavisnosti od klimatskih i ekoloških faktora podneblja. Grupa u okviru koje je urađena ova doktorska disertacija se dugi niz godina bavi proučavanjem biološke aktivnosti lekovitih biljaka i prirodnih proizvoda kao potencijalnih izvora novih lekova ili dijetetskih suplemenata. Biološki potencijal vrste iz roda *Plantago* je i ranije bio predmet istraživanja naše grupe, pri čemu je pokazano da pored poznatih vrsta, *P. lanceolata* i *P. major*, i neke manje poznate vrste kao što su *P. argentea* i *P. holosteam* mogu da budu dobar izvor biološki aktivnih komponenti (Beara i sar., 2009; Beara i sar. 2010; Beara i sar., 2012; Janković i sar., 2010; Janković i sar., 2012).

Istraživanja urađena u okviru ove doktorske disertacije predstavljaju nastavak prethodnih istraživanja. Naime, analizirano je šest vrsta bokvica: *P. altissima*, *P. argentea*, *P. holosteam* (poznata i pod nazivom *P. subulata* L., Hassemer i sar., 2017), *P. lanceolata*, *P. major* i *P. media*. Za pripremu ekstrakata su korišćeni samo listovi, kao deo biljke ovih bokvica koji se najčešće upotrebljava. S obzirom da su neke vrste bokvica zastupljene u ishrani u vidu čajeva, osim metanolnih ekstrakata pripremljeni su i čajevi (infuzi) listova svih navedenih vrsta u cilju potencijalne valorizacije ovih proizvoda kao funkcionalne hrane. Evaluacija hemijskog sastava odabranih vrsta bokvica predstavljala je prvi korak istraživanja, a zatim je, u cilju detaljnijeg proučavanja potencijalnih mehanizama anti-inflamatornog delovanja bokvica, ispitan uticaj metanolnih i vodenih ekstrakata navedenih vrsta na produkciju PGE₂ i TXA₂ u humanim U937 monocitima i makrofagama. Osim bokvica, ispitana je i aktivnost jedinjenja koja su se analizom hemijskog sastava izdvojila kao dominantna. Deo ovih istraživanja publikovan je u radu Majkić i saradnici iz 2020. godine.

6.3.1. Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i tanina u ekstraktima bokvica

Upotreba biljaka u tradicionalnoj medicini uslovljena je njihovim biološkim delovanjem, međutim, u savremenim istraživanjima, jedan od imperativa je i proučavanje hemijskog sastava u cilju određivanja, i eventualne izolacije, glavnih nosilaca biološke aktivnosti. Sa druge strane, jedinjenja prisutna u biljkama mogu da posluže i kao hemotaksonomski markeri različitih biljnih vrsta.

Validni taksonomski markeri vrsta iz roda *Plantago* su iridoidni glikozidi, pa je sadržaj ovih komponenti u različitim vrstama bokvica bio predmet velikog broja istraživanja, u cilju klasifikacije bokvica u različite podrodove. Sa druge strane, polifenolni profil bokvica je znatno slabije proučen. Naime, rod *Plantago* sadrži više od 250 vrsta, od kojih su najpoznatije i najrasprostranjenije *P. lanceolata* i *P. major*. Polifenolini profil ovih vrsta je najčešće analiziran, dok su istraživanja usmerena ka

drugim vrstama znatno manje zastupljena. Pregled literaturnih podataka o hemijskom sastavu vrsta analiziranih u ovom radu prikazan je u *Tabeli 4.6.*

Primenom spektrofotometrijskih metoda (*Poglavlje 5.3.1* i *5.3.2.*), određen je sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i tanina u pripremljenim ekstraktima, a dobijeni rezultati su prikazani u *Tabeli 6.9.*, i u *Prilogu (Poglavlje 9.3.1.)*. Ove spektrofotometrijske metode nisu visoko specifične i postoji nekoliko faktora koji ograničavaju njihovu upotrebu, međutim, veoma često se koriste jer pružaju preliminarne podatke o hemijskom sastavu i zastupljenosti različitih klasa jedinjenja.

Tabela 6.9. Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i tanina u ekstraktima bokvica*

Uzorak	Sadržaj ukupnih polifenola		Sadržaj ukupnih flavonoida		Sadržaj ukupnih tanina		
	µg GKE/ mg s.e.	V/M (%)	µg KvE/ mg s.e.	V/M (%)	µg KE/ mg s.e.	V/M (%)	% tanina u polifenolima
PALM	71.9 ± 2.58 ^{e, f, g}		12.0 ± 0.49 ^{d, e}		66.5 ± 3.23 ^d		73.1
PALV	50.4 ± 4.31 ^h	70.1	11.1 ± 0.90 ^e	92.5	48.7 ± 3.09 ^e	73.2	74.5
PARM	76.4 ± 5.10 ^e		30.4 ± 2.24 ^b		66.3 ± 2.04 ^d		68.8
PARV	64.0 ± 1.99 ^{f, g}	83.8	10.8 ± 0.53 ^e	35.5	42.2 ± 3.95 ^{e, f}	66.7	61.3
PHOM	190 ± 8.21 ^a		39.9 ± 1.17 ^a		163 ± 4.90 ^a		68.6
PHOV	117 ± 6.28 ^c	61.2	23.5 ± 0.35 ^c	58.9	95.6 ± 6.31 ^c	58.6	66.3
PLAM	53.9 ± 0.13 ^{g, h}		6.33 ± 0.28 ^f		47.5 ± 3.63 ^{e, f}		70.2
PLAV	35.0 ± 2.00 ⁱ	64.9	5.58 ± 0.46 ^f	88.2	28.4 ± 1.40 ^f	59.8	62.9
PMAM	53.2 ± 2.17 ^h		10.3 ± 0.46 ^e		48.9 ± 1.35 ^e		73.2
PMAV	38.4 ± 1.03 ⁱ	72.2	5.86 ± 0.41 ^f	56.9	32.4 ± 1.20 ^f	66.3	66.0
PMEM	137 ± 3.78 ^b		24.2 ± 0.49 ^c		128 ± 1.61 ^b		73.6
PMEV	86.4 ± 5.32 ^d	63.1	14.4 ± 0.60 ^d	59.5	80.1 ± 7.71 ^d	62.6	70.4

Oznake: GKE - ekvivalenati galne kiseline, KvE - ekvivalenati kvercetina; KE - ekvivalenati katehina; M - metanolni ekstrakt; V - vodeni ekstrakt; PAL - *P. altissima*; PAR - *P. argentea*; PHO - *P. holosteuum*; PLA - *P. lanceolata*; PMA - *P. major*; PME - *P. media*. *vrednosti prikazane u tabeli su srednja vrednost tri merenja ± standardna devijacija; V/M - odnos sadržaja polifenola, flavonoida i tanina u vodenim i metanolnim ekstraktima; ^fRazličita slova (a-i) u eksponentu u istoj koloni tabele ukazuju na statistički značajnu razliku između vrednosti, pri nivou značajnosti ≤ 0.05 (na osnovu post-hoc Tukey-evog HSD testa).

Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja određen je primenom *Folin-Cicolateu*-ove metode, a rezultati su izraženi kao µg ekvivalenata galne kiseline u mg suvog ekstrakta (µg GKE/mg s.e.). Na osnovu priloženih rezultata uočava se da su metanolni ekstrakti bogatiji polifenolnim jedinjenjima u odnosu na infuze odgovarajućih vrsta. Najveći sadržaj polifenolnih jedinjenja detektovan je u vrsti *P. holosteuum* (190 µg GKE/mg s.e. u metanolnom, odnosno 117 µg GKE/mg s.e. u vodenom ekstraktu). Zanimljivo je da su najniže količine polifenola određene u najpoznatijim vrstama *P. lanceolata* (53.9 i 35.0 µg GKE/mg s.e u metanolnom ekstraktu i infuzu, redom) i *P. major* (53.2 i 38.4 µg GKE/mg s.e u metanolnom ekstraktu i infuzu).

U odnosu na prethodno analizirane metanolne ekstrakte herbe vrsta *P. argentea*, *P. holosteuum*, *P. major*, *P. maritima* i *P. media*, metanolne ekstrakte ispitivane u ovoj tezi odlikuje veći sadržaj polifenolnih jedinjenja. Međutim, i u prethodnom radu su vrste *P. media* (70.1 mg GKA/g s.e.) i *P. holosteuum* (68.8 mg GKA/g s.e.) bile bogatije polifenolnim jedinjenjima u odnosu na vrste *P. major* (42.6 mg GKA/g s.e.) i *P. argentea* (38.4 mg GKA/g s.e., Beara i sar., 2009.). S obzirom da je u navedenom radu analizirana cela herba, a ne samo listovi, osim različitih klimatskih i ekoloških faktora, potencijalno objašnjenje različitog sadržaja, može da bude i neravnomerna distribucija

polifenolnih jedinjenja unutar biljke. Naime, najverovatnije je sadržaj polifenola najveći upravo u listovima bokvica, usled čega su ekstrakti pripremljeni od listova bogatiji polifenolnim jedinjenjima u odnosu na ekstrakte pripremljene od cele herbe.

Količina polifenolnih jedinjenja u ekstraktu PMAM približna je sadržaju polifenola određenom u etanolnom ekstraktu vrste *P. major* (60.9 mg GKE/g s.e., Stanisavljević i sar., 2008). Janković i saradnici (2012) su u etanolnim ekstraktima pripremljenim ultrazvučnom ekstrakcijom odredili drugačiji odnos u sadržaju polifenola između vrsta *P. holostium* (16.4 mg GKE/g suve herbe) i *P. lanceolata* (25 mg GKE/g suve herbe) u odnosu na onaj detektovan u ovom radu u listovima navedenih vrsta.

Sadržaj ukupnih flavonoida izražen je u μg ekvivalenata kvercetina u mg suvog ekstrakta (μg KvE/mg s.e.). Najmanje ukupnih flavonoida prisutno je PLAV (5.58 μg KvE/mg s.e), dok se kao najbogatiji i ovom klasom jedinjenja izdvaja PHOM (39.9 μg KvE/mg s.e). U svim vrstama je detektovan veći sadržaj flavonoida u metanolnim u odnosu na vodene ekstrakte, međutim, dok je razlika u sadržaju polifenolnih jedinjenja između vodenih i metanolnih ekstrakata uniformna (oko 30% niži sadržaj u vodenim ekstraktima), u pogledu ukupnih flavonoida uočavaju velike varijacije u zavisnosti od vrste. Na primer, ne postoji statistički značajna razlika u sadržaju flavonoida između ekstrakata PALM i PALV, odnosno PLAM i PLAV, dok je u drugim vrstama detektovano skoro dvostruko (*P. holostium*, *P. major*, *P. media*), odnosno trostruko (*P. argentea*) više flavonoida u metanolnim u odnosu na vodene ekstrakte. U prethodnim studijama su detektovane niže koncentracije ukupnih flavonoida u metanolnim ekstraktima herbe vrsta *P. argentea*, *P. holostium*, *P. major* i *P. media* (Beara i sar., 2009).

Određen sadržaj tanina predstavlja razliku u sadržaju polifenolnih jedinjenja pre i posle taloženja tanina PVPP, a rezultati su izraženi kao μg ekvivalenata katehina u mg suvog ekstrakta (μg KE/mg s.e.). U pogledu sadržaja ukupnih tanina, uočava se sličan model varijabilnosti kao i u pogledu sadržaja ukupnih polifenola: najviše tanina prisutno je u vrsti *P. holostium*, najmanje u vrsti *P. lanceolata*, a metanolni ekstrakti sadrže približno 30-40% više tanina u odnosu na vodene ekstrakte odgovarajuće vrste. Procentualni udeo detektovanih tanina u ukupnim polifenolnim jedinjenjima je približan u svim vrstama bokvica, odnosno sadržaj tanina čini oko dve trećine sadržaja ukupnih polifenola. Visok sadržaj tanina je i ranije detektovan u bokvicama (Fayera i sar., 2018).

Na osnovu prikazanih rezultata spektrofotometrijskih analiza, može da se zapazi da je u metanolnim ekstraktima detektovan veći sadržaj ukupnih polifenola i tanina, pri čemu vrsta, a ne tip ekstrakta više utiče na dati sadržaj. U pogledu flavonoida, razlike u sadržaju između vodenih i metanolnih ekstrakata variraju u zavisnosti od vrste (od 7 – 65%). Interesantno je da su slabije ispitane vrste, prvenstveno *P. holostium* i *P. media*, bogatije svim analiziranim klasama polifenolnih jedinjenja u odnosu na poznate predstavnike *P. lanceolata* i *P. major*. Ovi podaci upućuju na potrebu za daljim ispitivanjima polifenolnog profila ekstrakata bokvica, sa posebnim naglaskom na ekstrakte manje proučenih vrsta.

6.3.2. Sadržaj odabranih jedinjenja u ekstraktima bokvica

U cilju detaljnije evaluacije hemijskog sastava, primenom visoko specifične i selektivne HPLC-MS/MS tehnike analizirano je prisustvo 47 jedinjenja od kojih je detektovano 25 jedinjenja (9 fenolnih kiselina, 11 flavonoida, 3 kumarina, 1 karboksilna i 1 triterpenska kiselina; *Tabela 6.10-6.12.*). Takođe, primenom HPLC-DAD tehnike, analizirano i detektovano je tri jedinjenja koja su karakteristična za bokvice, 1 feniletanoidni glikozid, akteozid, poznat i pod nazivom verbaskozid (*Tabela 6.10*) i 2 iridoida (aukubin i katalpol; *Tabela 6.12*).

Među jedinjenjima koja su analizirana, ali nisu kvantifikovana nalazi se 5 fenolnih kiselina (galna, cimetna, 3,4-dihidroksicimetna, *o*-kumarinska i sinapinska), 12 flavonoida (bajkalein, bajkalin, daidzein, genistein, epikatehin, epigalokatehin galat, izoramnetin, katehin, kemferol, kvercetin, kvercitrin, miricetin, naringenin) i 2 lignana (matairezinol i sekoizolaricirezionol) i jedan kumarin (skopoletin). Usled preklapanja pikova, hiperozid (kvercetin-3-*O*-galaktozid) i izokvercetin (kvercetin-3-*O*-glukozid) kvantifikovani su zajedno kao kvercetin-3-*O*-heksozid.

U pogledu sadržaja fenolnih kiselina (*Tabela 6.10.*) uočavaju se pretežno kvantitativne, a ne kvalitativne razlike između vrsta. Od 9 detektovanih fenolnih kiselina, 5 pripada grupi hidroksibenzoevih, a 4 grupi hidroksicimentih kiselina. Dominantna fenolna kiselina u vrstama *P. altissima*, *P. holosteum* i *P. lanceolata* je hlorogenska kiselina, dok je u drugim vrstama detektovan znatno niži sadržaj ove kiseline. Zanimljivo je da su razlike između sadržaja ove kiseline u vodenom i metanolnom ekstraktu vrsta *P. altissima* (267 i 312 µg/g s.e.) i *P. lanceolata* (363 i 393 µg/g s.e.) relativno male, pri čemu su vodeni ekstrakti malo bogatiji, dok metanolni ekstrakt *P. holosteum* sadrži skoro 40 puta više hlorogenske kiseline od vodenog ekstrakta iste vrste. U vodenom ekstraktu *P. holosteum*, kao i u oba ekstrakta *P. argentea*, *P. major* i *P. media*, najzastupljenija fenolna kiselina je vanilinska kiselina. Međutim, kao vrsta najbogatija vanilinskom kiselinom izdvojila se *P. altissima*, koja je ujedno sadržala i visoku koncentraciju hlorogenske kiseline.

Tabela 6.10. Koncentracija* detektovanih fenolnih kiselina i feniletanoidnog glikozida u ekstraktima bokvica

Uzorak	Fenolne kiseline-($\mu\text{g/g s.e.}$) [‡]									Feniletanoidni glikozid (mg/g s.e.)
	2,5-Dihidroksi-benzoeva kiselina	Ferulna kiselina	Hlorogenska kiselina	Kafena kiselina	<i>p</i> -OH-benzoeva kiselina	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	Protokatehinska kiselina	Siringinska kiselina	Vanilinska kiselina	Akteoizid [§]
PALM	2.74 ± 0.22 ^d	7.29 ± 0.73 ^c	267 ± 13.48 ^e	8.12 ± 0.57 ⁱ	6.42 ± 0.39 ^f	2.32 ± 0.21 ^{d,e}	4.32 ± 0.35 ^e	2.60 ± 0.26 ^{f§}	164 ± 16.4 ^a	77.7 ± 1.36 ^e
PALV	2.87 ± 0.23 ^d	8.63 ± 0.86 ^b	312 ± 15.59 ^d	13.3 ± 0.93 ^e	4.94 ± 0.30 ^g	3.82 ± 0.34 ^{c,d,e}	4.72 ± 0.38 ^e	3.06 ± 0.31 ^{f§}	160 ± 16.0 ^a	45.6 ± 0.79 ⁱ
PARM	7.83 ± 0.63 ^a	6.57 ± 0.66 ^c	33.7 ± 1.68 ^f	9.94 ± 0.70 ^{g,h}	15.6 ± 0.94 ^a	10.6 ± 0.95 ^b	3.66 ± 0.29 ^{f,g}	14.1 ± 1.41 ^a	55.7 ± 5.57 ^{d,e}	61.9 ± 1.08 ^f
PARV	3.92 ± 0.31 ^c	5.05 ± 0.51 ^d	33.5 ± 1.68 ^f	8.30 ± 0.58 ⁱ	10.2 ± 0.61 ^c	6.99 ± 0.63 ^{b,c}	2.92 ± 0.23 ^h	8.28 ± 0.83 ^b	33.4 ± 3.34 ^f	34.2 ± 0.60 ^j
PHOM	3.80 ± 0.30 ^c	6.68 ± 0.67 ^c	566 ± 28.3 ^a	19.5 ± 1.36 ^d	15.0 ± 0.90 ^a	37.5 ± 3.38 ^a	11.7 ± 0.94 ^a	3.63 ± 0.36 ^{e,f§}	57.5 ± 5.75 ^{d,e}	189 ± 3.30 ^a
PHOV	5.33 ± 0.43 ^b	12.4 ± 1.24 ^a	14.5 ± 0.73 ^{f,g}	27.1 ± 1.90 ^a	13.7 ± 0.82 ^b	40.9 ± 3.68 ^a	7.65 ± 0.61 ^c	5.47 ± 0.55 ^{c,d}	68.4 ± 6.84 ^{c,d}	113 ± 1.97 ^d
PLAM	2.62 ± 0.21 ^d	8.60 ± 0.86 ^b	363 ± 18.15 ^c	8.64 ± 0.60 ^{h,i}	8.83 ± 0.53 ^d	5.61 ± 0.51 ^{c,d}	5.52 ± 0.44 ^d	3.47 ± 0.35 ^{e,f§}	94.3 ± 9.43 ^b	55.3 ± 0.96 ^g
PLAV	2.59 ± 0.21 ^d	9.28 ± 0.93 ^b	393 ± 19.7 ^b	11.6 ± 0.81 ^f	6.10 ± 0.37 ^f	5.52 ± 0.50 ^{c,d}	4.36 ± 0.35 ^e	3.10 ± 0.31 ^{f§}	91.3 ± 9.13 ^b	34.5 ± 0.60 ^j
PMAM	1.78 ± 0.14 ^e	4.15 ± 0.41 ^{e,f}	2.06 ± 0.10 ^g	11.0 ± 0.77 ^{f,g}	7.96 ± 0.48 ^e	1.31 ± 0.12 ^e	4.18 ± 0.33 ^{e,f}	6.15 ± 0.62 ^c	54.8 ± 5.48 ^e	77.9 ± 1.36 ^e
PMAV	1.57 ± 0.13 ^e	4.00 ± 0.40 ^f	1.55 ± 0.08 ^g	11.2 ± 0.79 ^{f,g}	5.13 ± 0.31 ^g	1.49 ± 0.13 ^e	3.26 ± 0.26 ^{g,h}	4.50 ± 0.45 ^{d,e}	32.3 ± 3.23 ^f	51.2 ± 0.89 ^h
PMEV	2.87 ± 0.23 ^d	4.75 ± 0.47 ^{d,e}	5.94 ± 0.30 ^{f,g}	23.2 ± 1.63 ^b	10.3 ± 0.62 ^c	1.34 ± 0.12 ^e	9.16 ± 0.73 ^b	14.6 ± 1.46 ^a	96.6 ± 9.66 ^b	152 ± 2.65 ^c
PMEV	3.86 ± 0.31 ^c	5.20 ± 0.52 ^d	5.04 ± 0.25 ^{f,g}	21.2 ± 1.49 ^c	8.60 ± 0.52 ^{d,e}	1.78 ± 0.16 ^e	7.32 ± 0.59 ^c	14.0 ± 1.40 ^a	72.7 ± 7.27 ^c	167 ± 2.92 ^b

Oznake: M - metanolni ekstrakt; V - vodeni ekstrakt; PAL - *P. altissima*; PAR - *P. argentea*; PHO - *P. holosteam*; PLA - *P. lanceolata*; PMA - *P. major*; PME - *P. media*.

*vrednosti prikazane u tabeli predstavljaju sadržaj jedinjenja ± standardna devijacija određena po metodi Orčić i sar., 2014; [‡]Različita slova (a-i) u eksponentu u istoj koloni tabele ukazuju na statistički značajnu razliku između vrednosti, pri nivou značajnosti od ≤ 0.05 (na osnovu post-hoc Tukey-evog HSD testa); [§]Ispod limita detekcije i kvantitacije u rastvaraču po metodi Orčić i sar., 2014; [§]vrednosti prikazane u tabeli predstavljaju sadržaj jedinjenja ± standardna devijacija određena na osnovu 4 merenja pri koncentraciji 333.4 $\mu\text{g/mL}$.

Uopšteno, ne može se zapaziti pravilnost u razlici detektovanih koncentracija fenolnih kiselina između vodenih i metanolnih ekstrakata. Potencijalno objašnjenje može da predstavlja sam način pripreme ekstrakta. Naime, metanolni ekstrakti su pripremljeni ekstrakcijom 80% metanolom u odnosu 1 g biljnog materijala : 10 mL, a zatim su, nakon uparavanja i rastvaranja u toploj vodi, nepolarne komponente uklonjene ekstrakcijom sa petrol-etrom. Uz izuzetak PHOM, prinosi prečišćenih ekstrakata iznosili su između 25 i 30% početnog biljnog materijala. Sa druge strane, priprema vodenih ekstrakata listova bokvica urađena je po uobičajenoj proceduri pripreme čaja. Usitnjen suv biljni materijal je preliven ključalom destilovanom vodom (1 g biljnog materijala : 40 mL H₂O) i maceriran 10 minuta na sobnoj temperaturi. Prinosi vodenih ekstrakata, uz PHOV kao izuzetak, iznosili su između 35 i 48.6% mase početnog biljnog materijala. Povećan prinos je i očekivan, jer nakon maceracije, nije sledila faza dodatnog uklanjanja prisutnih manje polarnih komponenti, a samim tim i je izbegnuta i mogućnost redukcije ukupne mase ekstrakta. Usled većeg prinosa vodenih ekstrakata, može da se pretpostavi da bi razlike u sadržaju navedenih jedinjenja bile veće ukoliko bi se rezultati izrazili po g biljnog materijala.

Zanimljiva je činjenica da je vanilinska kiselina bila dominantna *p*-hidroksibenzoeva kiselina u svim ekstraktima, dok se u klasi hidroksicimentnih kiselina ne može utvrditi pravilnost. Hlorogenska kiselina je bila dominantna hidroksicimentna kiselina u ekstraktima vrsta *P. altissima*, *P. argentea*, *P. lanceolata* i metanolnom ekstraktu *P. holosteam*, a sa druge strane, u vodenom ekstraktu *P. holosteam* i ekstraktima *P. major* i *P. media*, dominantna je bila kafena kiselina, prekursor hlorogenske kiseline.

Prikazani rezultati su u saglasnosti sa prethodnim radovima u kojima je u vrstama *P. major* i *P. media* određen veći sadržaj kafene u odnosu na hlorogensku kiselinu (Olennikov i sar., 2011). Međutim, nasuprot rezultatima prikazanim u Tabeli 6.10., Jurišić-Grubešić i sar.(2013), su u vrstama *P. altissima* i dve vrste *P. holosteam*, odredili veći sadržaj kafene u odnosu na hlorogensku kiselinu, dok su u jednoj vrsti *P. holosteam* detektovali samo hlorogensku, a ne i kafenu kiselinu. U radu Ronsted i saradnici (2003) navedeno je da je hlorogenska kiselina detektovana u podrodu *Albicans*, a da nije prisutna u drugim bokvicama, po klasifikaciji iz navedenog rada ovom rodu pripadaju vrste *P. altissima*, *P. argentea* i *P. lanceolata*. Nepoznat je uzrok razlika u sadržaju hlorogenske kiseline u ekstraktima *P. holosteam*, a ovi rezultati upućuju na potrebu za daljim proučavanjem ove vrste, o čijem polifenolnom profilu do sada postoji samo nekoliko navoda.

Ukoliko se uporede rezultati istraživanja izvedenog u okviru ove disertacije sa rezultatima prethodnih studija, mogu se uočiti i kvantitativne i kvalitativne razlike u sastavu fenolnih kiselina. Na primer, u infuzu listova *P. lanceolata* Ferrazzano i saradnici (2015) su pored vanilinske, hlorogenske i kafene kiseline, detektovali i galnu i cimetnu kiselinu, koje su u okviru ovog rada bila analizirane, ali ne i detektovane. Takođe, oni su odredili visoke koncentracije nekoliko derivata galne kiseline koji nisu bili predmet proučavanja u okviru ovog rada. Hlorogenska kiselina je određena kao dominantna fenolna kiselina u vrstama *P. altissima* i *P. lanceolata* različitog porekla (Beara i sar., 2012, Bahadori i sar., 2020), pri čemu kvantifikovane koncentracije znatno variraju između radova.

Feniletanoidini glikozid, akteozid, zastupljen je u visokim koncentracijama u svima ispitivanim ekstraktima. Evaluacija hemijskog sastava pokazala je da je od analiziranog 51 jedinjenja, upravo akteozid dominantno jedinjenje u svim vrstama. Najniži sadržaj detektovan je u ekstraktima PARV i PLAV (34.2 i 34.5 mg/g s.e., redom), dok su pet puta veće koncentracije detektovane u PHOM (189 mg/g s.e.). Uz vrstu *P. media* kao izuzetak, metanolni ekstrakti sadrže veće koncentracije ovog jedinjenja u odnosu na vodene ekstrakte. Rezultati prethodnih studija potvrđuju da je akteozid, pored plantamajozida, jedno od dominantnih polifenolnih jedinjenja prisutnih u bokvicama, pri čemu se koncentracija polifenolnih jedinjenja razlikuje u zavisnosti od starosti biljke, kao i dela biljke koji se koriste za istraživanja (Zubair i sar., 2011). U navedenom radu su detektovane znatno niže koncentracije akteozida u etanolnim ekstraktima mladih (0.02 mg/g suvog lista) i starih listova (0.01 mg/g suvog lista). Sa druge strane, sadržaj akteozida određen od strane Janković i saradnika (2012) u etanolnim ekstraktima vrsta *P. holosteam* (5.8 mg/g suve herbe) i *P. lanceolata* (21.7 mg/g suve herbe) je znatno veći i približniji koncentracijama detektovanim u ovom radu (PHOM 35 mg/g suvog lista i PLAM 16.4 mg/g suvog lista). *P. holosteam* je jedina biljna vrsta koja je prikupljena u junu (2017. godine), dok su druge vrste prikupljene krajem jula i početkom avgusta (2015 godine). Postoji mogućnost da je u junu biljka *P. holosteam* bila u ranijem stadijumu razvića u odnosu na bokvice prikupljene u avgustu, te i to može biti jedan od razloga zašto je u ovoj vrsti detektovan veći sadržaj akteozida. Naime, po rezultatima rada Zubair i saradnika (2011), veći sadržaj akteozida je prisutan u mladim listovima.

Uopšteno, u pogledu fenolnih kiselina uočavaju se velike kvantitativne razlike između ekstrakata, a kao najzastupljenije se izdvajaju hlorogenska i vanilinska kiselina. Sadržaj hlorogenske veoma varira između vrsta (PMAV - 1.55 µg/g s.e., PHOM - 566 µg/g s.e.) dok je vanilinska kiselina detektovana u svim uzorcima u relativno visokoj koncentraciji, u opsegu od 32.3 µg/g s.e. (PMAV) do 164 µg/g s.e. (PALM). Evaluacijom hemijskog profila feniletanoidni glikozid, akteozid, se izdvojio kao dominantno jedinjenje, a vrste u kojima su određene najveće koncentracije su *P. holosteam* (189 i 113 mg/g u metanolnom ekstraktu i infuzu, redom) i *P. media* (152 i 167 mg/g u metanolnom ekstraktu i infuzu, redom).

U pogledu detektovanih flavonoida, najzastupljeniji su bili flavoni (apigenin, luteolin, njihovi glikozidi i krizoeriol). Osim njih, detektovani su jedino *O*-glikozidi flavonola (kemferol-3-*O*-glukozid, kvercetin-3-*O*-heksozid i rutin). Postoje velike kvantitativne i manje kvalitativne razlike u sadržaju određenih flavonoida između vrsta (Tabela 6.11.).

Tabela 6.11. Koncentracija* detektovanih flavonoida u ekstraktima bokvica

Flavonoidi ($\mu\text{g/g s.e.}$) [‡]											
Uzorak	Ametoflavon	Apigenin	Apigenin-7-O-glukozid	Apiin	Krizoeriol	Kvercetin-3-O-heksozid	Kemferol-3-O-glukozid	Luteolin	Luteolin-7-O-glukozid	Rutin	Viteksin
PALM	3.00±0.09 ^d	1.57±0.11 ^e	5.56 ± 0.28 ^h	0.27 ± 0.01 ^{c§}	3.00 ± 0.09 ⁱ	12.5 ± 0.75 ^e	4.59 ± 0.18 ^h	19.5 ± 0.97 ^e	41.7 ± 1.25	2.34 ± 0.07 ^b	0.36 ± 0.02 ^{i§}
PALV	4.21±0.13 ^c	6.40 ± 0.45 ^b	2.73 ± 0.14 ^{ij}	0.31 ± 0.02 ^{c§}	4.69 ± 0.14 ^{g,h}	10.6 ± 0.64 ^e	1.97 ± 0.08 ⁱ	80.7 ± 4.03 ^a	23.4 ± 0.70 ^{g,h}	1.86 ± 0.06 ^{b,c}	0.18 ± 0.01 ^{j§}
PARM	5.24±0.16 ^b	15.8 ± 1.11 ^a	17.5 ± 0.88 ^{c,d}	Nd	9.03 ± 0.27 ^f	19.2 ± 1.15 ^d	16.7 ± 0.67 ^e	14.5 ± 0.73 ^f	62.1 ± 1.86 ^f	0.11 ± 0.00 ^{e§}	0.44 ± 0.02 ^g
PARV	8.04±0.24 ^a	5.68 ± 0.40 ^{b,c}	14.4 ± 0.72 ^e	Nd	3.17 ± 0.10 ^j	18.9 ± 1.14 ^d	14.7 ± 0.59 ^f	4.72 ± 0.24 ^g	54.2 ± 1.63 ^f	1.00 ± 0.03 ^d	0.68 ± 0.03 ^d
PHOM	Nd [‡]	4.58 ± 0.32 ^d	20.8 ± 1.04 ^b	0.24 ± 0.01 ^{c§}	35.1 ± 1.05 ^a	50.6 ± 3.04 ^a	19.1 ± 0.76 ^d	32.7 ± 1.63 ^c	1098 ± 33.0 ^a	22.1 ± 0.66 ^a	0.43 ± 0.02 ^{g,h}
PHOV	Nd	1.60 ± 0.11 ^e	12.2 ± 0.61 ^f		18.2 ± 0.55 ^c	35.0 ± 2.10 ^c	14.7 ± 0.59 ^f	19.4 ± 0.97 ^e	688 ± 20.6 ^b	0.87 ± 0.03 ^d	0.52 ± 0.03 ^f
PLAM	2.48±0.07 ^{f§}	2.26 ± 0.16 ^e	15.9 ± 0.79 ^{d,e}	2.72 ± 0.14 ^a	3.65 ± 0.11 ^{ij}	7.70 ± 0.46 ^f	24.6 ± 0.98 ^b	23.4 ± 1.17 ^d	450 ± 13.5 ^c	0.61 ± 0.02 ^{d,e}	1.34 ± 0.07 ^b
PLAV	2.66±0.08 ^e	5.96 ± 0.42 ^{b,c}	8.18 ± 0.41 ^g	2.32 ± 0.12 ^b	4.25 ± 0.13 ^{h,i}	5.75 ± 0.34 ^f	8.55 ± 0.34 ^g	50.6 ± 2.53 ^b	169 ± 5.08 ^d	Nd	0.45 ± 0.02 ^g
PMAM	1.71±0.05 ^{h§}	0.56 ± 0.04 ^{f§}	49.7 ± 2.49 ^a	0.32 ± 0.02 ^{c§}	28.9 ± 0.87 ^b	43.7 ± 2.62 ^b	51.2 ± 2.05 ^a	0.77 ± 0.04 ^h	104 ± 3.13 ^e	1.63 ± 0.05 ^c	1.58 ± 0.08 ^a
PMAV	2.05±0.06 ^{g§}	0.42 ± 0.03 ^{f§}	17.8 ± 0.89 ^c		10.4 ± 0.31 ^d	20.2 ± 1.21 ^d	21.1 ± 0.84 ^c	1.05 ± 0.05 ^h	49.5 ± 1.48 ^{f,g}	0.64 ± 0.02 ^{d,e}	1.03 ± 0.05 ^c
PMEM	2.09±0.06 ^{g§}	5.13 ± 0.36 ^{c,d}	4.23 ± 0.21 ^{h,i}	Nd	5.62 ± 0.17 ^g	1.47 ± 0.09 ^g	1.67 ± 0.07 ⁱ	1.49 ± 0.07 ^{g,h}	8.12 ± 0.24 ^h	0.45 ± 0.01 ^{d,e}	0.36 ± 0.02 ^{h,i§}
PMEV	2.12±0.06 ^{g§}	1.75 ± 0.12 ^e	1.70 ± 0.09 ^j	0.31 ± 0.02 ^{c,§}	3.36 ± 0.10 ^{ij}	0.91 ± 0.05 ^{g§}	1.64 ± 0.07 ⁱ	1.12 ± 0.06 ^{g,h}	7.19 ± 0.22 ^h	0.53 ± 0.02 ^{d,e}	Nd

Oznake: M - metanolni ekstrakt; V - vodeni ekstrakt; PAL - *P. altissima*; PAR - *P. argentea*; PHO - *P. holosteam*; PLA - *P. lanceolata*; PMA - *P. major*; PME - *P. media*.

*vrednosti prikazane u tabeli predstavljaju sadržaj jedinjenja ± standardna devijacija određena po metodi Orčić i sar., 2014; [‡]Različita slova (a-i) u eksponentu u istoj koloni tabele ukazuju na statistički značajnu razliku između vrednosti, pri nivou značajnosti od ≤ 0.05 (na osnovu post-hoc Tukey-evog HSD testa); [§]Ispod limita detekcije i kvantitacije u rastvaraču po metodi Orčić i sar., 2014; [‡]Nd - nije detektovano.

U PARM je detektovano najviše apigenina, koji je u ekstraktima vrste *P. major* prisutan samo u tragovima. Sa druge strane, ekstrakti ove vrste (PMAM i PMAV) se izdvajaju po visokom sadržaju apigenin-7-*O*-glukozida među metanolnim ekstraktima i infuzima. Interesantna je činjenica da su, za razliku od drugih vrsta, vodeni ekstrakti *P. altissima* i *P. lanceolata* posedovali znatno veće koncentracije apigenina u odnosu na metanolne ekstrakte. Upravo u ovim vodenim ekstraktima detektovan je i najviši sadržaj luteolina (80.7 µg/g s.e u PALV, 50.6 µg/g s.e. u PLAV). Po izuzetno visokim koncentracijama luteolin-7-*O*-glukozida izdvojili su se i ekstrakti vrste *P. holosteum*. Uopšteno, PHOM, PLAM, PMAM sadrže najveće koncentracije flavonoidnih glikozida.

Kvalitativne razlike se uočavaju u sadržaju ametoflavona, apiina, rutina i viteksina. Najveće koncentracije apiina (apigenin-7-*O*-apisioglukozida) su detektovane u vrsti *P. lanceolata*, dok je u drugim ekstraktima zastupljen u tragovima. Ametoflavon (biapigenin) prisutan je u vrstama *P. altissima*, *P. argentea* i *P. lanceolata*, prvenstveno u njihovim vodenim ekstraktima. Viteksin (apigenin-8-*C*-glukozid) je, kao i apigenin-7-*O*-glukozid, samo u znatno nižim koncentracijama, najzastupljeniji u PMAM. PHOM se izdvaja po visokim koncentracijama rutina.

U poređenju sa prethodnim rezultatima, uočavaju se velike razlike u koncentracijama, ali sličan model varijabilnosti detektovanih flavonoida. Naime, flavoni su najzastupljenija klasa flavonoida u bokvicama, pretežno zastupljena u formi glikozida (Kawashty i sar., 1994). U radu Beare i saradnika (2009) pokazano je da je luteolin-7-*O*-glukozid zastupljeniji u ekstraktima *P. holosteum* i *P. major* u odnosu na luteolin, apigenin, apigenin-7-*O*-glukozid i rutin, a da je *P. argentea* bogatija apigeninom u odnosu na druge vrste. Uprkos kvantitativnim razlikama, ovi rezultati su u skladu sa rezultatima prikazanim u Tabeli 6.11. Međutim, uočavaju se i mnoga odstupanja između navedenih rezultata. Na primer, u rezultatima prikazanim u Tabeli 6.11., PHOM se izdvaja po visokim koncentracijama rutina, dok je u navedenom radu rutin u vrsti *P. holosteum* prisutan u tragovima, odnosno u nižim koncentracijama nego u vrstama *P. argentea* i *P. media* (Beara i sar., 2009). Zanimljivo je da je većina istraživanja usmerena ka analizi polifenolnog profila vrsta *P. argentea* i *P. holosteum* izvedena na vrstama poreklom sa teritorije Srbije, Hrvatske i Crne Gore (Beara i sar., 2009; Janković i sar., 2012; Jurišić-Grubešić, 2013), a iako navedeni regioni nisu geografski udaljeni, uočavaju se znatne razlike u hemijskom sastavu. Takođe, uočavaju se kvantitativne i kvalitativne razlike u odnosu na polifenolni profil vrsta *P. altissima* i *P. lanceolata* određenih u radu Beara i saradnika (2012). U metanolnom ekstraktu *P. major* prethodno su detektovani katehin i galna kiselina, što nije u saglasnosti sa našim rezultatima (Mello i sar., 2012). Studija koju su izveli Ferrazzano i saradnici (2015) potvrđuje da su dominantni flavonodi u infuzu listova *P. lanceolata* bili apigenin i luteolin. Pored njih, detektovano je i nekoliko jedinjenja koja nisu detektovana u ovom radu (kemferol, kvercetin, ramnetin, naringenin).

Uopšteno, na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da apigenin, luteolin i njihovi glikozidi predstavljaju najzastupljenija polifenolna jedinjenja u bokvicama. PHOM se izdvaja po visokom sadržaju krizoeriola, kvercetin-3-*O*-heksozida, luteolin-7-*O*-glukozida i rutina.

U *Tabeli 6.12.* prikazane su koncentracije detektovanih kumarina, karboksilne i triterpenske kiseline i iridoide u ekstraktima bokvica.

Eskuletin je jedini kumarin prisutan u svim ispitanim vrstama, a detektovan je u opsegu koncentracija od 1.96 $\mu\text{g/g}$ s.e. (PARV) do 14.1 $\mu\text{g/g}$ s.e. (PMEM). U ekstraktu PMEM prisutno je i najviše izoskopoletina, dok su najveće koncentracije umbeliferona određene u PALM. Uopšteno, zapaža se da metanolne ekstrakte odlikuje veći sadržaj kumarina u odnosu na vodene ekstrakte iste vrste.

Prekursor polifenolnih jedinjenja, hinska kiselina detektovana je u svim ekstraktima. Poređenjem ekstrakata iste vrste ne može se uočiti pravilnost, jer metanolni ekstrakti *P. altissima* i *P. argentea* sadrže veće koncentracije hinske kiseline u odnosu na vodene ekstrakte, dok je kod drugih vrsta situacija obrnuta.

Nasuprot tome, u metanolnim ekstraktima svih ispitivanih vrsta ursolna kiselina je prisutna u znatno višim koncentracijama u odnosu na vodene ekstrakte. U prethodnoj studiji (Kartini i sar., 2014), ursolna kiselina nije detektovana u infuzima vrste *P. major*. Pretpostavlja se da je razlog struktura ursolne kiseline, odnosno da je ovo triterpensko jedinjenje slabo rastvorno u vodi.

Ursolna kiselina je poznata po različitim biološkim aktivnostima, uključujući i anti-inflamatorno delovanje, odnosno selektivnu inhibiciju COX-2 (Ringbom i sar., 1998). Kao izvor ove kiseline u navedenom ispitivanju korišćena je *P. major*, poznata po visokom sadržaju ursolne kiseline. Prema nama dostupnim podacima, sadržaj ursolne kiseline u nekim drugim vrstama bokvica, kao što su *P. altissima*, *P. argentea*, *P. holosteum* i *P. media* je prvi put ispitan u okviru ovog rada. Zanimljivo je da je sadržaj ursolne kiseline u do sada nedovoljno ispitanim vrstama *P. argentea* (1210 $\mu\text{g/g}$ s.e) i *P. media* (711 $\mu\text{g/g}$ s.e), znatno veći od sadržaj ursolne kiseline u vrsti *P. major* (371 $\mu\text{g/g}$ s.e). Na osnovu prikazanih rezultata, postoje indicije da bi i ove vrste mogle da se koriste za izolovanje ursolne kiseline.

Tabela 6.12. Koncentracija* detektovanih[‡] kumarina, karboksilne i triterpenske kiseline i iridoida u ekstraktima bokvica

Uzorak	Kumarini (µg/g s.e.)			Karboksilna kiselina (µg/g s.e.)	Triterpenska kiselina (µg/g s.e.)	Iridoidi (mg/g s.e) [#]	
	Eskuletin	Izoskopoletin	Umbeliferon	Hinska kiselina	Ursolna kiselina	Aukubin	Katalpol
PALM	4.54 ± 0.27 ^e	3.84 ± 0.38 ^b	6.31 ± 0.63 ^a	76.9 ± 7.69 ^e	188 ± 18.8 ^{d,e}	24.8 ± 3.11 ^c	37.2 ± 3.94 ^a
PALV	4.48 ± 0.27 ^e	Nd [‡]	2.15 ± 0.22 ^{c,d}	49.8 ± 4.98 ^g	48.7 ± 4.87 ^f	20.9 ± 2.62 ^{c,d}	26.7 ± 2.83 ^b
PARM	3.61 ± 0.22 ^f	Nd	Nd	120 ± 12.0 ^c	1205 ± 120 ^a	39.9 ± 5.01 ^a	7.68 ± 0.82 ^d
PARV	1.96 ± 0.12 ^g	Nd	2.20 ± 0.22 ^c	86.7 ± 8.67 ^e	106 ± 10.6 ^{e,f}	32.8 ± 4.11 ^b	2.20 ± 0.23 ^e
PHOM	7.08 ± 0.42 ^c	Nd	Nd	76.9 ± 7.69 ^e	217 ± 21.7 ^d	14.4 ± 1.80 ^{e,f}	Nd
PHOV	6.69 ± 0.40 ^c	Nd	1.10 ± 0.11 ^e	103 ± 10.3 ^d	77.0 ± 7.70 ^f	9.68 ± 1.21 ^{f,g}	Nd
PLAM	5.29 ± 0.32 ^d	1.86 ± 0.19 ^c	0.47 ± 0.05 [§]	58.3 ± 5.83 ^{f,g}	139 ± 13.9 ^{d,e,f}	20.7 ± 2.60 ^{c,d}	13.5 ± 1.43 ^c
PLAV	4.66 ± 0.28 ^e	Nd	2.61 ± 0.26 ^c	63.4 ± 6.34 ^f	53.4 ± 5.34 ^f	17.3 ± 2.16 ^{d,e}	9.21 ± 0.98 ^d
PMAM	5.22 ± 0.31 ^d	Nd	1.71 ± 0.17 ^d	65.3 ± 6.53 ^f	371 ± 37.1 ^c	9.00 ± 1.13 ^g	Nd
PMAV	3.89 ± 0.23 ^f	Nd	Nd	160 ± 16.0 ^a	113 ± 11.3 ^{e,f}	3.85 ± 0.48 ^h	Nd
PMEM	14.1 ± 0.85 ^a	9.33 ± 0.93 ^a	3.42 ± 0.34 ^b	29.0 ± 2.90 ^b	711 ± 71.1 ^b	44.3 ± 5.55 ^a	Nd
PMEV	8.80 ± 0.53 ^b	Nd	2.36 ± 0.24 ^c	134 ± 13.4 ^b	87.8 ± 8.78 ^{e,f}	40.1 ± 5.03 ^a	Nd

Oznake: M - metanolni ekstrakt; V - vodeni ekstrakt; PAL - *P. altissima*; PAR - *P. argentea*; PHO - *P. holosteam*; PLA - *P. lanceolata*; PMA - *P. major*; PME - *P. media*.

*vrednosti prikazane u tabeli predstavljaju sadržaj jedinjenja ± standardna devijacija određena po metodi Orčić i sar., 2014; [‡]Različita slova (a-i) u eksponentu u istoj koloni tabele ukazuju na statistički značajnu razliku između vrednosti, pri nivou značajnosti od ≤ 0.05 (na osnovu post-hoc Tukey-evog HSD testa); [§]Ispod limita detekcije i kvantitacije u rastvaraču po metodi Orčić i sar., 2014; [‡]Nd - nije detektovano; vrednosti prikazane u tabeli predstavljaju sadržaj jedinjenja ± standardna devijacija određena na osnovu 4 merenja pri koncentraciji 333.4 µg/mL.

Prethodno je navedeno da su iridoidni glikozidi hemotaksonomski markeri roda *Plantago* te ne iznenađuje da su detektovani u visokim koncentracijama u svim navedenim vrstama. Aukubin je detektovan u svim ekstraktima, a najveće koncentracije su prisutne u PMEM (44.3 mg/g s.e.) i PARM (39.9 mg/g s.e.).

Sa druge strane, katalpol je prisutan samo u vrstama *P. altissima*, *P. argentea* i *P. lanceolata*, a najveći sadržaj je detektovan u vrsti *P. altissima* (37.2 i 26.7 mg/g s.e. u PALM i PALV, redom). Ovi rezultati su u skladu sa prethodno objavljenim podacima. Naime, smatra se da tri navedene vrste pripadaju istoj sekciji roda *Plantago*, a pored drugih morfoloških i hemijskih karakteristika, prisustvo katalpola je jedna od osobina po kojoj se diferenciraju (Taskova i sar., 2002; Jurišić i sar., 2004).

Analizom detektovanih količina aukubina i katalpola, uočava se da je sadržaj iridoida uslovljen prvenstveno vrstom bokvice, uz minimalne razlike između vodenih i metanolnih ekstrakata iste vrste. Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima Janković i saradnika (2010), koji su analizom uzoraka dobijenih ekstrakcijom 50% etanolom utvrdili da je sadržaj aukubina u vrstama *P. lanceolata* i *P. holosteum* u približnom odnosu 3:2. Rezultati Klockars i saradnika (1993) pokazuju da se koncentracije iridoidnih glikozida značajno menjaju tokom razvoja biljke. Sadržaj iridoida u mladim listovima *P. lanceolata* čini 9%, a smanjuje se sa starenjem. Takođe, menja se i međusoban odnos aukubina i katalpola: katalpol je dominantan u mladim, a aukubin u starim listovima.

Usled velikih varijacija u sastavu sekundarnih molekula biljaka u zavisnosti od stadijuma razvića, analiziranih organa biljke, klimatskih i ekoloških faktora podneblja na kom je biljka prikupljena, uočavaju se velike razlike između rezultata iz različitih studija. Međutim, slični zaključci su izdvojeni u pogledu prisustva dominantnih jedinjenja, i upravo se ona i koriste kao hemotaksonomski markeri. Analizom hemijskog sastava u okviru ove disertacije određeno je između 5.5 i 20% komponenti prisutnih u suvom ekstraktu ispitivanih vrsta (Tabela 6.13.).

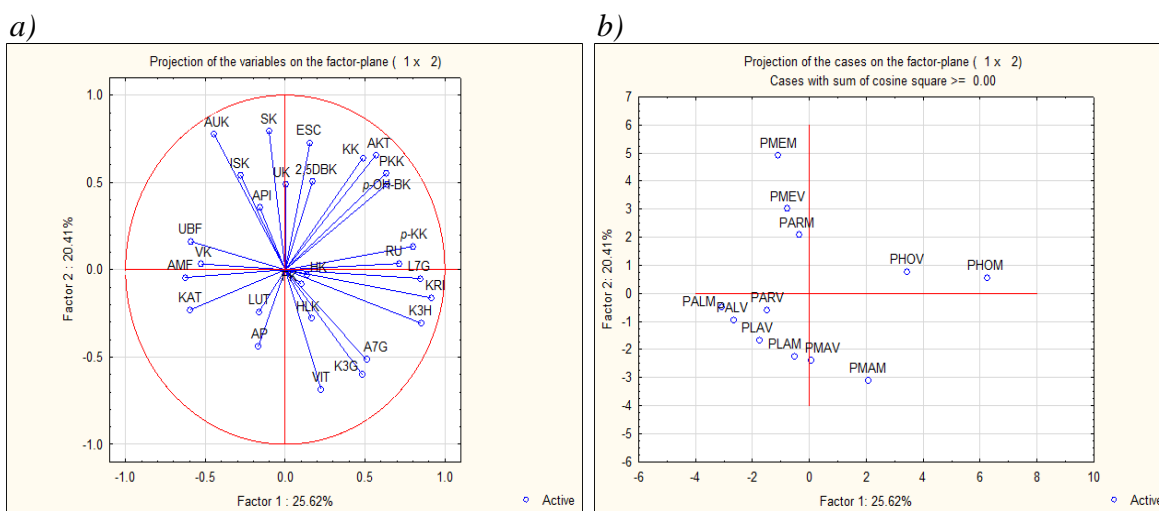
Tabela 6.13. Ukupan sadržaj kvantifikovanih jedinjenja

Uzorak	Sadržaj kvantifikovanih polifenolnih jedinjenja mg/g s.e.	Sadržaj kvantifikovanih iridoida mg/g s.e.	Ukupan sadržaj kvantifikovanih jedinjenja mg/g s.e. % s.e.	
PALM	78.3	62.0	141	14.1
PALV	46.2	47.6	93.9	9.39
PARM	62.2	47.6	111	11.1
PARV	34.5	35.0	69.7	6.97
PHOM	191	14.4	206	20.6
PHOV	114	9.70	124	12.4
PLAM	56.3	34.1	90.7	9.01
PLAV	35.3	26.5	61.8	6.18
PMAM	78.3	9.00	87.7	8.77
PMAV	51.4	3.85	55.5	5.55
PMEM	152	44.3	197	19.7
PMEV	168	40.1	208	20.8

Oznake: M - metanolni ekstrakt; V - vodeni ekstrakt; PAL - *P. altissima*; PAR - *P. argentea*; PHO - *P. holosteum*; PLA - *P. lanceolata*; PMA - *P. major*; PME - *P. media*

Zanimljivo je da se uočavaju znatne razlike između vrsta, na primer, u vrstama *P. holosteam*, *P. major* i *P. media* preko 80% determinisanog sastava čine polifenolna jedinjenja. Sa druge strane, u vrstama *P. altissima*, *P. argentea* i *P. lanceolata* određen je približan sadržaj polifenola i iridoida. U odnosu na masu suvog ekstrakta, procentualni udeo determinisanih jedinjenja je bio najveći u ekstraktima vrsta *P. holosteam* i *P. media*, a najmanji u *P. lanceolata* i *P. major*. Naravno, u cilju potpune hemijske karakterizacije ekstrakata bokvica, dalja istraživanja mogu biti usmerena ka određivanju drugih klasa jedinjenja kao što su polisaharidi i masne kiseline, koji nisu bile predmet istraživanja ovog rada, a poznato je da se nalaze u bokvicama, ali i u nekih drugih polifenolnih jedinjenja, kao što je na primer plantamajozid, koji je prisutan u visokim koncentracijama u ispitivanim vrstama.

Hemijskim sastavom uslovljeno je biološko delovanje biljnih vrsta, a istovremeno, razlike u hemijskom sastavu mogu da posluže za razvrstavanje vrsta u različite rodove i sekcije, kao i klasifikaciju novootkrivenih vrsta. Kako bi se utvrdilo koje od detektovanih komponenti najviše doprinose diferenciranju navedenih vrsta bokvica, na normalizovane (standardizovane) vrednosti koncentracija detektovanih komponenti primenjena je analiza glavnih komponenti (PCA). Rezultati su prikazani na Slici 6.3. i u Prilogu (Poglavlje 9.3.1.).



Slika 6.3. Analiza glavnih komponenti detektovanih jedinjenja u ekstraktima bokvica

- (a) Doprinos varijabli (detektovanih jedinjenja) na grafiku opterećenja (*distribution of variables on loadings plot*);
 (b) Raspodela analiziranih ekstrakata na osnovu vrednosti dve glavne komponente (*distribution of samples on scores plot*).

Oznake: (a) AKT - akteozid, AMF - ametoflavon, AP - apiin, API - apigenin, A7G - apigenin-7-*O*-glukozid, AUK - aukubin, 2,5DBK - 2,5-dihidroksi-benzoeva kiselina, ESC - eskuletin, FK - ferulna kiselina, HLK - hlorogenska kiselina, HK - hinska kislina, ISK - izoskopoletin, KAT - katalpol, KK - kafena kiselina, KRI - krizoeriol, K3H - kvercetin-3-*O*-heksozid, K3G - kemferol-3-*O*-glukozid, LUT - luteolin, L7G - luteolin-7-*O*-glukozid, *p*-OH-BK - *p*-OH-benzoeva kiselina, *p*KK - *p*-kumarinska kiselina, PKK - protokatehinska kiselina, RU - rutin, SK - siringinska kiselina, VK - vanilinska kiselina, VIT - viteksin, UK - ursolna kiselina, UBF - umbeliferon. (b) M - metanolni ekstrakt; V - vodeni ekstrakt; PAL - *P. altissima*; PAR - *P. argentea*; PHO - *P. holosteam*; PLA - *P. lanceolata*; PMA - *P. major*; PME - *P. media*

Zajednički doprinos faktora 1 i faktora 2 ukupnoj varijaciji iznosi 46.03% (F1 - 20.41%, F2 - 25.62%). Uočava se da su na osnovu varijacije hemijskog sastava analizirani ekstrakti u načelu grupisani po vrstama bokvica. Prema varijaciji sadržaja

flavonoidih glikozida, vrsta *P. major* je lokalizovana u donjem desnom uglu. *P. holosteam* odlikuje najveći sadržaj većine analiziranih jedinjenja, što je reflektovano diferenciranjem od svih drugih vrsta u gornji desni ugao. Ekstrakti vrsta *P. altissima* i *P. lanceolata*, kao i vodeni ekstrakt *P. argentea* su pozicionirani u donjem levom uglu grafika, prvenstveno prema sadržaju katalpola i ametoflavona. Jedini je ekstrakt PARM odvojen od vrsta iz ove sekcije. On je lokalizovan u gornjem levom uglu grafika, blizu ekstraktata vrste *P. media*, zahvajući visokom sadržaju aukubina, apigenina, siringinske kiseline i ursolne kiseline.

Rezultati istraživanja sprovedenih u okviru ove disertacije pružaju podatke o hemijskom sastavu do sada slabo proučenih vrsta bokvica. S obzirom da su, do sada slabo ispitane vrste, kao što su *P. holosteam*, *P. media* i *P. argentea* izuzetno bogate određenim biološki aktivnim jedinjenjima, dobijeni rezultati sugerišu na potrebu za daljim istraživanjima ovih vrsta bokvica u cilju valorizacije njihove upotrebe u prevenciji ili lečenju različitih oboljenja.

Posebno su interesantni rezultati analize hemijskog sastava čajeva pripremljenih od različitih vrsta bokvica. Naime, sve ispitane vodene ekstrakte (infuze), koji bi se konzumirali kao čajevi, odlikuje izuzetno raznovrstan i bogat hemijski sastav. Mnoga od detektovanih jedinjenja, kao što su na primer aukubin, akteozid, hlorogenska kiselina, apigenin i luteolin su poznata po dobroj biološkoj aktivnosti i blagotvornom dejstvu na zdravlje. Na primer, rezultati *in vivo* studija pokazuju da hlorogenska kiselina (Xu i sar., 2010), apigenin (He i sar., 2019), luteolin (He i sar., 2019; Park i Song, 2019) i luteolin-7-*O*-glukozid (Park i Song, 2019) ispoljavaju anti-inflamatorno i hepatoprotektivno delovanje. Iako su ispitivane koncentracije u navedenim radovima mnogo veće od koncentracija koje su detektovane u ekstraktima bokvica, postoje indicije da upravo ova jedinjenja doprinose pozitivnom biološkom delovanju bokvica. Naime, u preglednom radu (Zhang i sar., 2019), navodi se mogućnost da ukoliko više jedinjenja deluje istim mehanizmom, usled sinergističkog delovanja, ta jedinjenja ostvaruju aktivnost i pri mnogo nižim koncentracijama od onih pri kojima bi pojedinačne komponente ispoljile efekat.

Sa druge strane, jedinjenja kao što su akteozid i aukubin, ispoljavaju aktivnost i pri koncentracijama koje mogu da se unesu u organizam konzumiranjem čaja od bokvica. Tako na primer, akteozid ispoljava hipotenzivni efekat pri koncentraciji od 10 mg/kg telesne mase (Chen i sar., 2012a), što je količina koju bi odrasla osoba (80 kg) mogla da unese u organizam konzumiranjem nešto manje od dve šolje čaja (jedna šolja sadrži 200 mL) pripremljenog od vrste *P. media*. Takođe, *in vivo* studije na miševima pokazuju da akteozid (2 mg/kg, López-Rodríguez i sar., 2019) deluje gastroprotektivno i antidepresivno, a na osnovu sadržaja akteozida u vodenim ekstraktima (Tabeli 6.10.), aproksimativno, konzumiranje između pola šolje (*P. media*) i 2.5 šolje (*P. lanceolata*) čaja od svih analiziranih vrsta bokvica bi moglo da obezbedi količine akteozida potrebne da se ispolji navedeni biološki potencijal.

U pogledu biološke aktivnosti i sadržaja aukubina u bokvicama, zanimljivo je nedavno istraživanje Potočnjaka i saradnika (2020) u kom je pokazano da aukubin (1.5 i 5 mg/kg) supresuje nefrotoksičnost uzrokovanu cisplatinom, lekom koji se upotrebljava u tretmanu različitih tumora. Na osnovu ovih rezultata, postoje naznake da bi

konzumiranje između jedne i četiri šolje *P. media* i *P. holosteum* čaja moglo da ublaži neke od kontraindikacija koje se javljaju pri upotrebi navedenog leka.

Posebno je interesantna studija (Nannoni i sar., 2020a) u kojoj je ispitivan preparat *Verbascox*[®], pripremljen od ekstrakata vrsta *P. lanceolata* i *Lipia citriodora* (Palau) Kunth, i standardizovan na sadržaj verbaskozida $\geq 5\%$ i sadržaj aukubina $\geq 2\%$. Utvrđeno je da dvonedeljna primena tablete *Verbascox*[®] (800 mg dnevno) ublažava bol i poboljšava pokretljivost pacijenta koji imaju blage do umerene oblike osteoartritisa, a da je efekat uporediv sa efektom pilule celekoksiba (200 mg). U *Verbascox*[®] tableti od 800 mg sadržaj verbaskozida je minimalno 40 mg, a aukubina 16 mg, a jedna šolja čaja svih analiziranih vrsta bokvica sadrži više od 40 mg verbaskozida, dok jedino vrste *P. holosteum* i *P. major* sadrže manje od 16 mg aukubina u jednoj šolji čaja. Na osnovu navedenog, postoje indicije da bi dnevno konzumiranje jedne šolje čaja od bokvica moglo da ublaži simptome osteoartritisa, a da bi najdelotvorniji bili čajevi vrste *P. media* (1 šolja sadrži 416 mg akteozida i 99.7 mg aukubina) i *P. argentea* (1 šolja sadrži 120 mg akteozida i 115 mg aukubina).

Prikazani rezultati doprinose valorizaciji potencijala čajeva od bokvica u smislu njihove upotrebe kao funkcionalne hrane. Takođe, prikazani rezultati sugerišu na potrebu za daljim ispitivanjima biološkog potencijala u cilju otkrivanja mehanizama kojim ove vrste mogu da deluju, ali i detaljne karakterizacije hemijskog sastava u cilju dobijanja standardizovanih preparata.

6.3.3. Uticaj ekstrakata bokvica na produkciju PGE₂ i TXA₂

Stimulacija zarastanja rana i ublažavanje nadražaja respiratornog sistema su najpoznatija dejstva bokvica. S obzirom da jedan od mehanizama ovih aktivnosti može da bude i suzbijanje inflamacije, anti-inflamatorni efekat vrsta *P. lanceolata* (Marchesan i sar., 1998; Fakhrudin i sar., 2017) i *P. major* (Nunez-Gullien i sar., 1997; Turel i sar., 2009; Hussan i sar., 2015b; Kartini i sar., 2017) bio je predmet različitih *in vivo* i *in vitro* istraživanja. Međutim, u samo nekoliko studija, ispitan je uticaj bokvica na metabolizam arahidonske kiseline u smislu detaljnije karakterizacije mehanizma anti-inflamatornog delovanja (Beara i sar., 2010; Beara i sar., 2012; Stenholm i sar., 2012; Zhou i sar., 2013; Fakhrudin i sar., 2017).

U cilju dodatne evaluacije uticaja bokvica na metabolizam arahidonske kiseline u okviru ove doktorske disertacije, ispitan je potencijal šest vodenih i šest metanolnih ekstrakata bokvica da moduliraju produkciju PGE₂ i TXA₂ korišćenjem različitih model sistema:

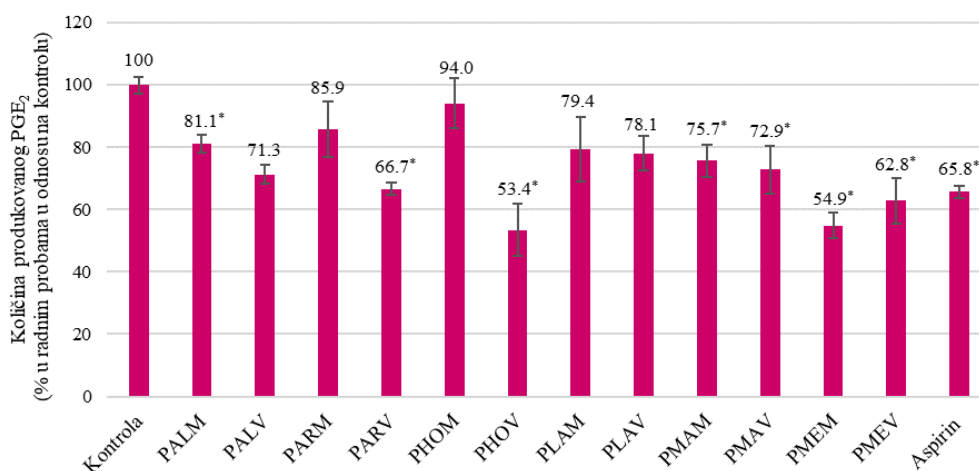
1. Nestimuliranih U937 monocita kojima je kao supstrat dodata arahidonska kiselina;
2. Monocita u kojima je inflamacija izazvana dodatkom LPS;
3. Makrofaga, nastalih nakon transformacije monocita delovanjem PMA, u kojima je inflamacija indukovana dodatkom LPS.

Potencijal vodenih i metanolnih ekstrakata analiziran je primenom prva dva model sistema, dok je na makrofagama ispitan modulatorni efekat četiri metanolna ekstrakta bokvica. Uticaj na produkciju PGE₂ i TXA₂ (izražen kao relativni odnos količine nastalih

proizvoda i internog standarda, PGB₂ u probama i kontroli) u navedenim model sistemima praćen je primenom HPLC-MS/MS tehnike. S obzirom da je TXA₂ ima veoma kratak poluživot (30 s), u svim eksperimentima praćen je njegov neaktivni metabolit, TXB₂. S obzirom da je koncentracija TXB₂ ekvivalentna TXA₂, a da je TXA₂ biološki aktivan lipidni medijator, u daljem tekstu će se govoriti o uticaju na produkciju TXA₂. Uticaj na ekspresiju mRNA enzima uključenih u produkciju PGE₂ i TXA₂ proučavan je na monocitima koji su stimulisani dodatkom LPS.

Uticaj bokvica na produkciju PGE₂ i TXA₂ u nestimulisanim monocitima, kojima je kao supstrat dodata arahidonska kiselina, ispitan je po proceduri opisanoj u *Poglavlju 5.4.4.1*. Rezultati dobijeni primenom ovog sistema odražavaju uticaj ekstrakata bokvica na produkciju PGE₂ i TXA₂ tokom homeostaze, kada je u monocitima ekspresovana samo COX-1.

Na *Histogramu 6.12*. prikazan je uticaj metanolnih i vodenih ekstrakata bokvica na produkciju PGE₂ tokom homeostaze. Aspirin, jedan od najprodavanijih anti-inflamatornih lekova, korišćen je kao referentno jedinjenje pri koncentraciji od 2.5 µmol/L (0.45 µg/mL).



Histogram 6.12. Uticaj ekstrakata bokvica† i aspirina‡ na produkciju PGE₂§ u nestimulisanim monocitima*

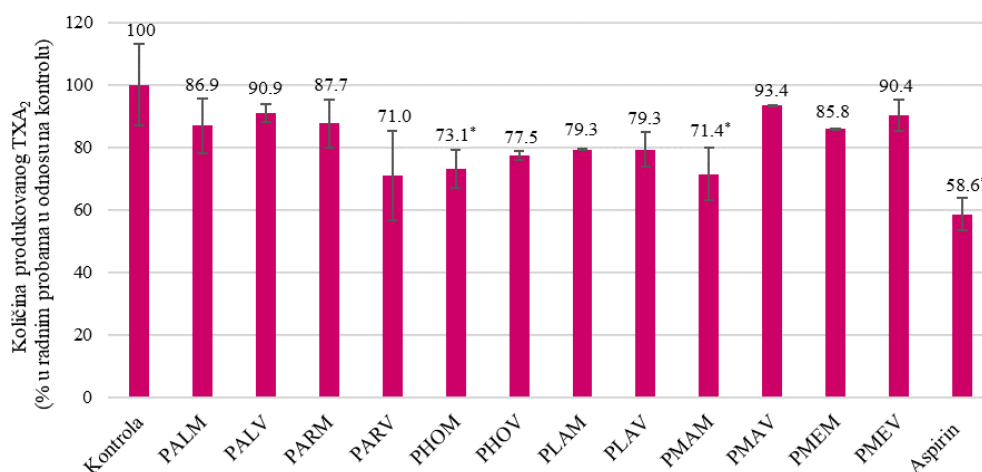
Oznake M - metanolni ekstrakt; V - vodeni ekstrakt; PAL - *P. altissima*; PAR - *P. argentea*; PHO - *P. holosteam*; PLA - *P. lanceolata*; PMA - *P. major*; PME - *P. media*; * statistički značajno različito od kontrole ($p \leq 0.05$); † koncentracija ekstrakata 500 µg/mL; ‡ koncentracija aspirina 2.5 µmol/L (0.45 µg/mL); § Količina produkovanog PGE₂ (%) predstavlja odnos površine pikova PGE₂ i internog standarda PGB₂ u radnim probama i površine pikova PGE₂ i PGB₂ u kontroli.

Od šest metanolnih ekstrakata bokvica, tri ekstrakta su ispoljila značajnu sposobnost inhibicije produkcije PGE₂. PMEM se izdvojio kao najaktivniji, ostvarivši inhibiciju od 45.1%, a osim njega značajnu aktivnost pokazali su i ekstrakti PMAM (inhibicija 24.3%) i PALM (inhibicija 18.9%).

Sa druge strane, uz izuzetak PLAV, svi vodeni ekstrakti su bili aktivni, a najjači efekat je imao PHOV. Uopšteno, osim u slučaju PMEV, vodeni ekstrakti su snažnije supresovali produkciju PGE₂, a najveće razlike u aktivnosti između različitih tipova ekstrakata uočene su kod vrsta *P. argentea* i *P. holosteam*.

Pri primenjenim koncentracijama (500 µg/mL) sposobnost ekstrakata PARV, PMEM, PMEV i PHOV da inhibiraju produkciju PGE₂ slična je potencijalu aspirina (0.45 µg/mL). Međutim, aspirin je primenjen u mnogo nižoj koncentraciji, tako da je izvesno da je njegov inhibitorni potencijal produkcije PGE₂ znatno bolji od navedenih ekstrakata.

Sposobnost ekstrakata bokvica da inhibiraju produkciju TXA₂ u nestimulisanim U937 monocitima prikazana je na *Histogramu 6.13*.



Histogram 6.13. Uticaj ekstrakata bokvica[‡] i aspirina[£] na produkciju TXA₂[§] u nestimulisanim monocitima*

Oznake M - metanolni ekstrakt; V - vodeni ekstrakt; PAL - *P. altissima*; PAR - *P. argentea*; PHO - *P. holosteum*; PLA - *P. lanceolata*; PMA - *P. major*; PME - *P. media*; * statistički značajno različito od kontrole ($p \leq 0.05$); [‡] koncentracija ekstrakata 500 µg/mL; [£] koncentracija aspirina 2.5 µmol/L (0.45 µg/mL); [§] Količina produkovanog TXA₂ (%) predstavlja odnos površine pikova TXA₂ i internog standarda PGB₂ u radnim probama i površine pikova TXA₂ i PGB₂ u kontroli.

Prikazani rezultati pokazuju da su jedino PHOM i PMAM ispoljili značajnu sposobnost inhibicije produkcije TXA₂ (26.9% i 28.6% inhibicije, redom).

Na osnovu prikazanih *Histograma 6.12*. i *6.13*. i imajući u vidu primenjenu koncentraciju, može se uočiti da svi ekstrakti ispoljavaju znatno slabiju sposobnost inhibicije produkcije PGE₂ i TXA₂ od aspirina. S obzirom da je aspirin inhibitor COX-1, za koji je poznat mehanizam delovanja (acetilovanje aktivnog centra COX), a koji prvenstveno inhibira produkciju TXA₂ i tako deluje kardioprotektivno, navedeni rezultati nisu iznenađujući. Međutim, s obzirom da prikazani model sistem predstavlja uticaj na produkciju PGE₂ i TXA₂ tokom homeostaze, jedinjenja koja bi u ovom model sistemu snažno supresovala njihovu produkciju mogla bi da ispolje negativne efekte, jer navedeni metaboliti arahidonske kiseline imaju važne fiziološke funkcije.

Osim toga, mogu se zapaziti i neke zanimljivosti. Na primer, *P. media* ekstrakti, koji su u odnosu na ekstrakte drugih vrsta pokazali značajan, međusobno vrlo sličan, potencijal inhibicije produkcije PGE₂, nisu ispoljili statistički značajnu inhibiciju TXA₂. Sa druge strane, *P. holosteum* ekstrakti imaju različit efekat: PHOM je najviše smanjio produkciju TXA₂, a tek je neznatno uticao na produkciju PGE₂, dok je PHOV najbolje inhibirao produkciju PGE₂, a na produkciju TXA₂ je ispoljio statistički značajan efekat.

Na osnovu prikazanih rezultata može da se pretpostavi da ove vrste ne deluju na COX-1, već na neki od terminalnih enzima uključenih u produkciju PGE₂ i TXA₂.

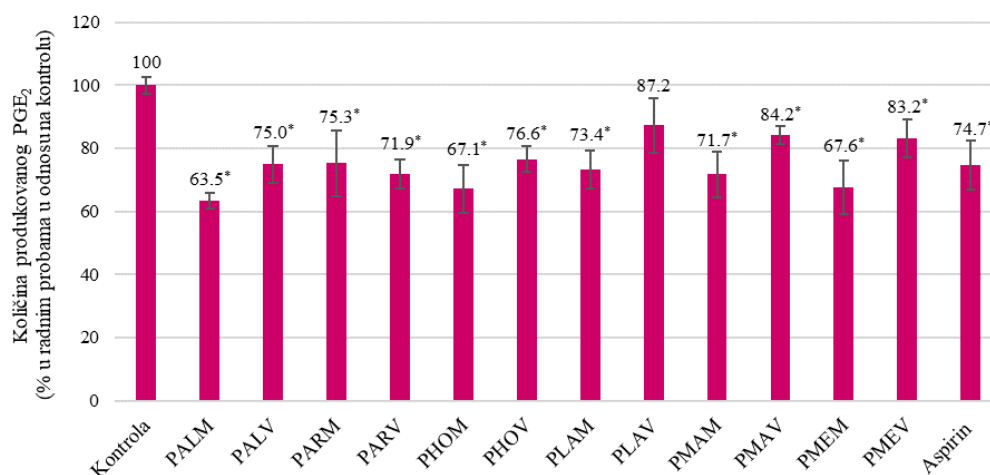
Ekstrakti vrsta *P. argentea*, *P. lanceolata* i metanolni ekstrakt vrste *P. major* ispoljavaju približno isti nivo inhibicije produkcije oba analizirana lipidna medijatora, što implicira da jedan od mogućih mehanizama delovanja može da bude upravo inhibicija COX-1, kao zajedničkog enzima uključenog u njihovu produkciju.

U odnosu na prethodna istraživanja naše grupe, u kojima je ispitivan uticaj metanolnih ekstrakata herbe bokvica na aktivnost COX-1 u humanim trombocitima uočavaju se određene sličnosti. Naime, u tim ispitivanjima (Beara i sar., 2010; Beara i sar., 2012) ekstrakt vrste *P. major* je ispoljio bolju aktivnost (IC₅₀ = 0.65 mg/mL) u odnosu na ekstrakte *P. lanceolata* (IC₅₀ = 2.00 mg/mL) i *P. altissima* (IC₅₀ = 4.42 mg/mL), što je u skladu sa redosledom aktivnosti ekstrakata PMAM-PLAM-PALM. Ipak, između aktivnosti ekstrakata analiziranih u okviru ove disertacije uočavaju se znatno manje razlike, koje nisu statistički značajne. S obzirom na razlike u poreklu biljnog materijala, samoj pripremi ekstrakata, model sistemu i primenjenim koncentracijama, uočene razlike između ove dve studije su očekivane.

U cilju detaljnijeg ispitivanja efekta na produkciju PGE₂ i TXA₂, koji imaju različitu ulogu u fiziološkim i patofiziološkim stanjima, analiziran je uticaj ekstrakata bokvica na produkciju ovih lipidnih medijatora i u monocitima u kojima je inflamacija indukovana LPS-om. Dodatak LPS inicira inflamatorni odgovor usled čega dolazi do ekspresije COX-2 i povećane ekspresije mPGES-1 u monocitima (*Poglavlje 6.1., Histogram 6.1.*), što je praćeno povećanom produkcijom PGE₂ i TXA₂ (Demasi i sar., 2000). Za nastajanje proizvoda ciklooksigenaznog puta u ovom slučaju odgovorne su i COX-1 i COX-2. Prikazani rezultati pokazuju sposobnosti ekstrakata bokvica da inhibiraju produkciju PGE₂ i TXA₂ u monocitima tokom početnih faza inflamacije, odnosno u procesima inflamacije gde su stimulisani monociti u krvi.

Osim uticaja na količinu produkovanog PGE₂ i TXA₂, u navedenom model sistemu je analiziran i efekat bokvica na ekspresiju mRNK svih enzima uključenih u produkciju PGE₂ i TXA₂, jer svi doprinose krajnjoj količini produkovanog PGE₂ i TXA₂.

Na *Histogramu 6.14.* prikazani su rezultati uticaja metanolnih i vodenih ekstrakata bokvica na produkciju PGE₂ u monocitima stimulisanim dodatkom LPS. Kao što je ranije navedeno, PGE₂ u ovom model sistemu nastaje delovanjem i COX-1 i COX-2, a uočava se da su ekstrakti pokazali različit potencijal inhibicije produkcije PGE₂ u odnosu na onaj koji su ispoljili na nestimulisanim monocitima, odnosno kada količina PGE₂ zavisi od aktivnosti COX-1, a ne i COX-2.



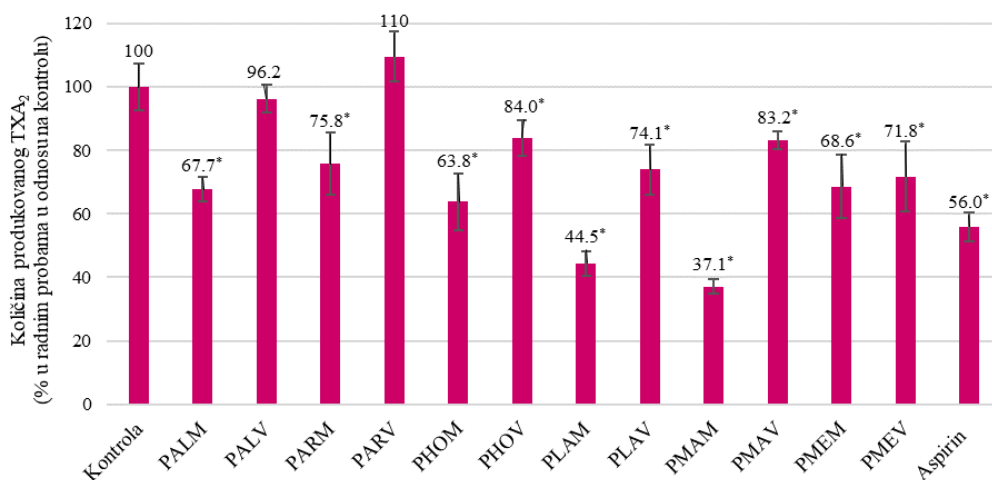
Histogram 6.14. Uticaj* ekstrakata bokvica[‡] i aspirina[§] na produkciju PGE₂ u LPS-stimulisanim monocitima

Oznake: M - metanolni ekstrakt; V - vodeni ekstrakt; PAL - *P. altissima*; PAR - *P. argentea*; PHO - *P. holosteam*; PLA - *P. lanceolata*; PMA - *P. major*; PME - *P. media*; * statistički značajno različito od kontrole ($p \leq 0.05$); [‡] koncentracija ekstrakata 500 $\mu\text{g/mL}$; [§] koncentracija aspirina 2.5 $\mu\text{mol/L}$ (0.45 $\mu\text{g/mL}$); [§] Količina produkovanog PGE₂ (%) predstavlja odnos površine pikova PGE₂ i internog standarda PGB₂ u radnim probama i površine pikova PGE₂ i PGB₂ u kontroli.

Svi ekstrakti osim PLAV su značajno inhibirali produkciju PGE₂ u monocitima stimulisanim dodatkom LPS. Pri koncentraciji od 500 $\mu\text{g/mL}$ metanolni ekstrakti bokvica su smanjili produkciju PGE₂ između 24.7% (PARM) i 36.5% (PALM), dok je inhibitorni potencijal vodenih ekstrakata bio u opsegu od 12.8% (PLAV) do 28.1% (PARV).

Interesantno je da su u nestimulisanim monocitima vodeni ekstrakti ispoljili veći efekat na produkciju PGE₂ u odnosu na metanolne ekstrakte, dok je situacija obrnuta u monocitima u kojima je inflamacija izazvana dodatkom LPS.

U pogledu inhibicije produkcije TXA₂ (Histogramu 6.15.) u LPS-stimulisanim monocitima, samo dva ekstrakta, PALV i PARV, nisu ispoljila statistički značajnu aktivnost.

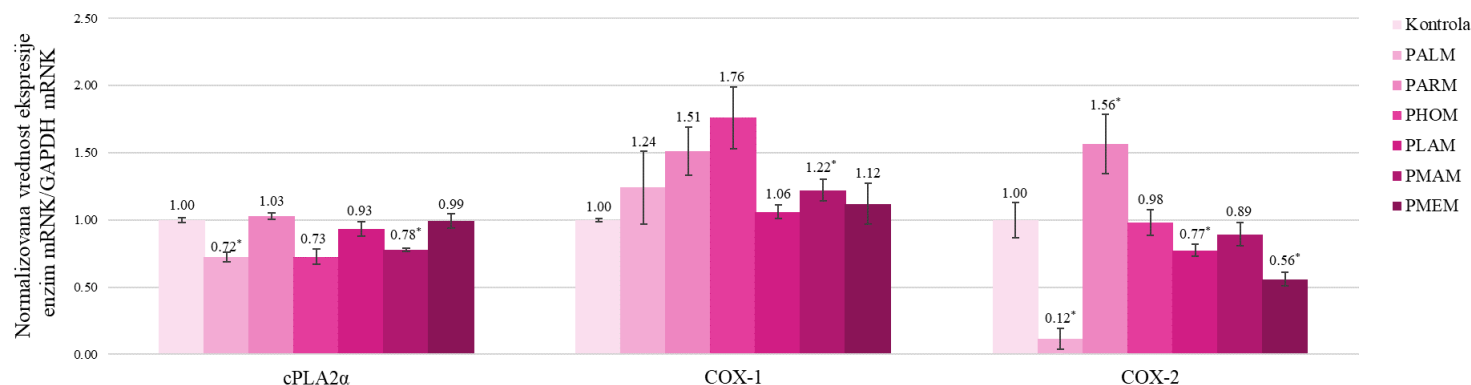


Histogram 6.15. Uticaj* ekstrakata bokvica[‡] i aspirina[£] na produkciju TXA₂[§] u LPS-stimulisanim monocitima

Oznake M - metanolni ekstrakt; V - vodeni ekstrakt; PAL - *P. altissima*; PAR - *P. argentea*; PHO - *P. holosteam*; PLA - *P. lanceolata*; PMA - *P. major*; PME - *P. media*; * statistički značajno različito od kontrole ($p \leq 0.05$); [‡] koncentracija ekstrakata 500 µg/mL; [£] koncentracija aspirina 2.5 µmol/L (0.45 µg/mL); [§] Količina produkovanog TXA₂ (%) predstavlja odnos površine pikova TXA₂ i internog standarda PGB₂ u radnim probama i površine pikova TXA₂ i PGB₂ u kontroli.

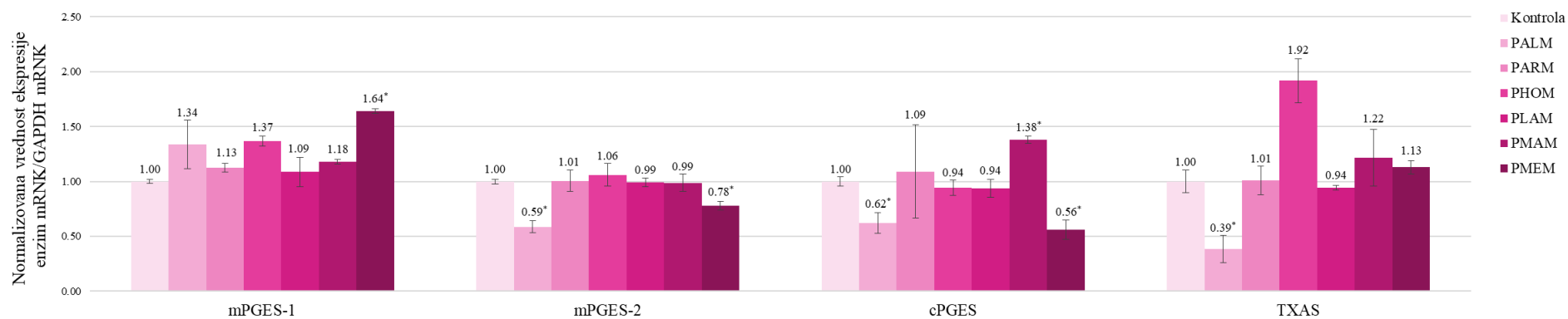
Najslabiji potencijal inhibicije produkcije TXA₂ ispoljili su *P. argentea* ekstrakti: PARM (24.2%) među metanolnim i PARV (nije aktivan) među vodenim ekstraktima. PLAM i PMAM su se izdvojili po izuzetnoj sposobnosti inhibicije produkcije TXA₂ (55.5 i 62.7%, redom). Iako se produkcija TXA₂ često povezuje sa aktivnošću COX-1, ekstrakti bokvica su ispoljili različit efekat u nestimulisanim monocitima i monocitima stimulisanim dodatkom LPS, ali PMAM je u oba slučaja bio najaktivniji. S obzirom da je TXA₂ izuzetno snažan faktor agregacije trombocita, na osnovu navedenih rezultata postoje indicije da bi jedinjenja prisutna u ovom ekstraktu mogla da se upotrebljavaju kao potencijalni anti-agregacioni agensi.

S obzirom da snižen nivo PGE₂ i TXA₂ može biti posledica inhibicije ekspresije mRNK, proteina ili aktivnosti enzima uključenih u produkciju ovih lipidnih medijatora, ispitan je i uticaj ekstrakata bokvica na ekspresiju mRNK enzima uključenih u sintezu PGE₂ i TXA₂: cPLA₂α, COX-1, COX-2 (Histogram 6.16. i 6.18), mPGES-1, mPGES-2, cPGES, TXAS (Histogram 6.17. i 6.19), kao jedan od mogućih mehanizama delovanja koji rezultuje sniženom krajnjom količinom proizvoda. Iako dodatak LPS ne povećava ekspresiju mRNK svih enzima, postoji mogućnost da analizirani ekstrakti utiču na ekspresiju mRNK i enzima koji nisu inducibilni, što posledično može da utiče i na količinu PGE₂ i TXA₂.



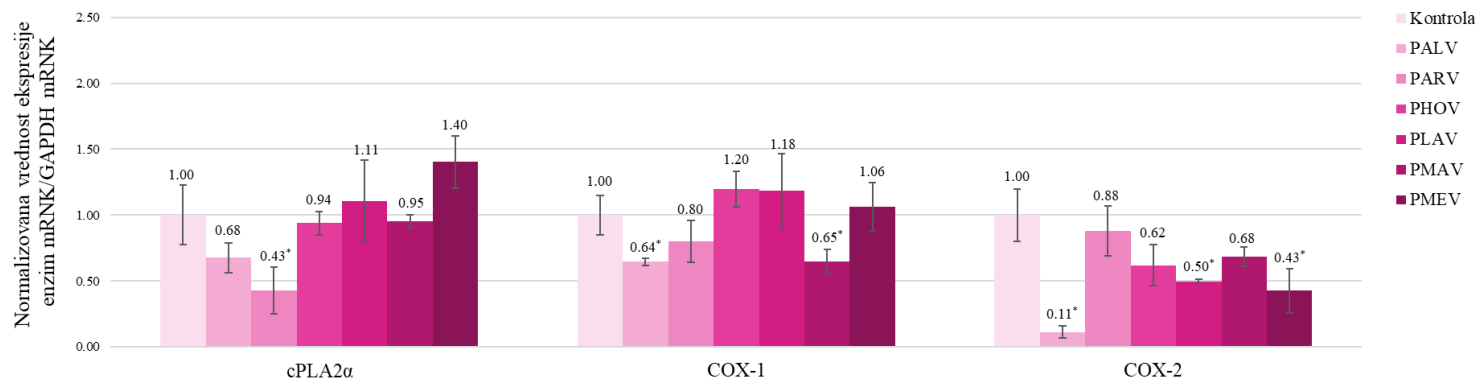
Histogram 6.16. Uticaj* metanolnih ekstrakata bokvica[‡] na ekspresiju cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNA u LPS-stimuliranim monocitima

Oznake: M - metanolni ekstrakt; PAL - *P. altissima*; PAR - *P. argentea*; PHO - *P. holosteuum*; PLA - *P. lanceolata*; PMA - *P. major*; PME - *P. media*; * statistički značajno različito od kontrole ($p \leq 0.05$); [‡] koncentracija ekstrakata 500 μg/mL;



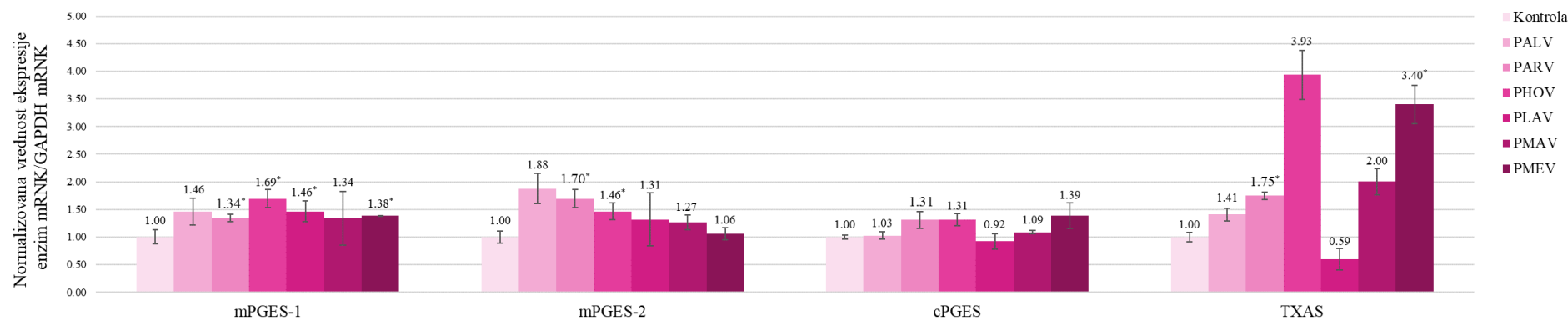
Histogram 6.17. Uticaj* metanolnih ekstrakata bokvica[‡] na ekspresiju mPGES-1, mPGES-2, cPGES i TXAS mRNA u LPS-stimuliranim monocitima

Oznake M - metanolni ekstrakt;; PAL - *P. altissima*; PAR - *P. argentea*; PHO - *P. holosteuum*; PLA - *P. lanceolata*; PMA - *P. major*; PME - *P. media*; * statistički značajno različito od kontrole ($p \leq 0.05$); [‡] koncentracija ekstrakata 500 μg/mL;



Histogram 6.18. Uticaj* vodenih ekstrakata bokvica[‡] na ekspresiju cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNA u LPS-stimulisanim monocitima

Oznake: V - vodeni ekstrakt; PAL - *P. altissima*; PAR - *P. argentea*; PHO - *P. holosteum*; PLA - *P. lanceolata*; PMA - *P. major*; PME - *P. media*; * statistički značajno različito od kontrole ($p \leq 0.05$); [‡] koncentracija ekstrakata 500 μg/mL;



Histogram 6.19. Uticaj* vodenih ekstrakata bokvica[‡] na ekspresiju mPGES-1, mPGES-2, cPGES i TXAS mRNA u LPS-stimulisanim monocitima

Oznake: V - vodeni ekstrakt; PAL - *P. altissima*; PAR - *P. argentea*; PHO - *P. holosteum*; PLA - *P. lanceolata*; PMA - *P. major*; PME - *P. media*; * statistički značajno različito od kontrole ($p \leq 0.05$); [‡] koncentracija ekstrakata 500 μg/mL;

U pogledu uticaja na ekspresiju mRNK cPLA₂α, enzima zaduženog za oslobađanje arahidonske kiseline iz fosfolipidnog dvosloja, PALM, PMAM, i PARV su smanjili njegovu ekspresiju. Zanimljivo je da je PARV za više od 50% smanjio ekspresiju mRNK cPLA₂α, dok PARM nije ispoljio modulatoreni efekat.

Reakciju koju katalizuje cPLA₂α predstavlja jednu od ključnih reakcija i ciklooksigenaznog i lipooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline. S obzirom da je u ovoj doktorskoj disertaciji kao supstrat korišćena egzogena arahidonska kiselina, uticaj ekstrakata na ekspresiju mRNK cPLA₂α ne može direktno da se poveže sa rezultatima prikazanim na *Histogramima 6.11-15*. Međutim, ekstrakti koji su supresovali ekspresiju ovog enzima predstavljaju zanimljiv predmet daljih istraživanja, jer potencijalno mogu da sprečavaju neželjene efekte delovanjem u inicijalnoj fazi metabolizma arahidonske kiseline.

Za razliku od metanolnih ekstrakata, od kojih je PMAM povisio ekspresiju mRNK COX-1 dva vodena ekstrakta, PALV i PMAV, su redukovala ekspresiju mRNK COX-1.

Ekstrakti tri vrste, *P. altissima*, *P. lanceolata* i *P. media*, su redukovali su inhibirali ekspresiju mRNK COX-2, enzima odgovornog za produkciju PGE₂ u inflamaciji. Uopšteno, vodeni ekstrakti su ispoljili nešto veću aktivnost u odnosu na metanolne ekstrakte iste vrste. Najbolju aktivnost su ispoljili ekstrakti vrste *P. altissima* koji su 8.3 puta (PALM), odnosno 9.1 puta (PALV) snizili ekspresiju COX-2 mRNK. Samo jedan ekstrakt, PARM, je povećao ekspresiju COX-2.

Zanimljivo je da su ekstrakti do sada slabo ispitanih vrsta, *P. altissima* i *P. media*, ispoljili bolji potencijal u odnosu na poznate vrste *P. lanceolata* i *P. major*, čija je anti-inflamatorna aktivnost i prethodno dokazana kako kroz tradicionalnu upotrebu, tako i u naučnim istraživanjima. Takođe, interesantno je da je ekstrakt PARM povećao ekspresiju i COX-1 i COX-2, ali da ovaj efekat nema direktan uticaj na krajnju količinu produkovanog PGE₂. Sa druge strane, ekstrakt iste biljne vrste je ispoljio najslabiji inhibitorni efekat na produkciju TXA₂.

U pogledu uticaja na ekspresiju terminalnih enzima uključenih u produkciju PGE₂, uočavaju se veoma intrigantni rezultati. Naime, nakon indukcije inflamacije dodatkom LPS, povećana je ekspresija proinflamatornih enzima, COX-2 i mPGES-1 mRNK. Međutim, iako isti stimulus povećava ekspresiju mRNK oba enzima, ekstrakti koji su redukovali ekspresiju COX-2 mRNK ne smanjuju i ekspresiju mRNK mPGES-1. Naprotiv, PMEM, koji je snažno supresovao ekspresiju COX-2 mRNK, povećao je ekspresiju mRNK mPGES-1. S druge strane, ekstrakti PALM i PMEM su snizili ekspresiju mRNK drugih enzima uključenih u produkciju PGE₂: mPGES-2 i cPGES. Nasuprot ovim rezultatima, PARV i PHOV su povećali ekspresiju kako mPGES-1, tako i mPGES-2, dok PLAV i PMAM, čajevi najpoznatijih vrsta bokvica, povećali samo ekspresiju mPGES-1. Pri čemu, intenzitet delovanja na ekspresiju mRNK terminalnih enzima ne može da se poveže sa efektom na COX-2. Prikazani rezultati pokazuju da su složene signalne kaskade uključene u ekspresiju ovih enzima i upućuju na potrebu za daljim ispitivanjima. Naime, iako je u dosadašnjim radovima najčešće praćen uticaj na ekspresiju inucibilnih enzima, COX-2 i mPGES-1, kao i konstitutivno ekspresovanog COX-1, prikazani rezultati pokazuju da je moguće modifikovati ekspresiju i mRNK drugih enzima uključenih u produkciju PGE₂ ciklooksigenaznim putem. Jedna od

budućih faza ispitivanja mogla bi da predstavlja analizu uticaja npr. na translacionom nivou. Uopšteno, na osnovu prikazanih rezultata, postoji mogućnost da smanjena ekspresija mRNK navedenih enzima, prvenstveno COX-2, ipak doprinosi smanjenoj količini produkovanog PGE₂ i bar delimično objašnjava inhibitorno dejstvo ekstrakata bokvica.

Kada je reč o uticaju na ekspresiju TXAS, zanimljivo je da su jedino ekstrakti PALM smanjio ekspresiju mRNK ovog enzima, dok ekstrakti PLAM i PMAM koji su snažno supresovali produkciju TXA₂ nisu uticali na ekspresiju mRNK navedenog enzima. Na osnovu prikazanog, može da se pretpostavi da jedinjenja prisutna u ovim vrstama deluju nekim drukim mehanizmima, npr. na nivou ekspresije proteina ili na nivou aktivnosti navedenog enzima. Takođe, interesantno je da se povećana ekspresija TXAS usled delovanja PHOV i PMEVI nije odrazila na količinu produkovanog TXA₂.

Na osnovu prethodno prikazanih rezultata, zapaža se da vodeni i metanolni ekstrakti iste vrste mogu da ispoljavaju različitu aktivnost. Produkciju PGE₂ u nestimulisanim monocitima najviše su inhibirali PHOV i PMEM, a u LPS-stimulisanim monocitima PALM. U pogledu inhibicije TXA₂ u nestimulisanim i LPS-stimulisanim monocitima izdvojio se PMAM. Ekstrakti vrsta *P. altissima*, *P. lanceolata* i *P. media* su naj snažnije redukovali ekspresiju COX-2 mRNK. Uticaj na ekspresiju drugih enzima nije bio uniforman kod različitih tipova ekstrakata.

U cilju određivanja veze između uticaja metanolnih ekstrakata bokvica na ekspresiju navedenih enzima i produkciju PGE₂ i TXA₂ u LPS stimulisanim monocitima izračunati su *Pearsonovi* koeficijenti korelacije između prikazanih rezultata (Tabela 6.14).

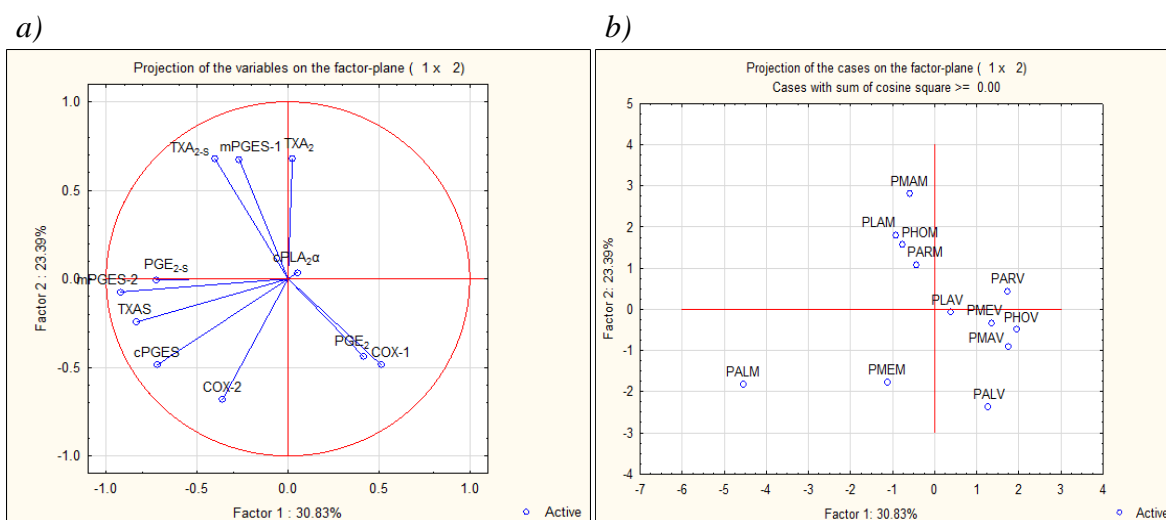
Tabela 6.14. Pearsonovi koeficijenti korelacije između količina produkovanih PGE₂ i TXA₂ i ekspresije enzima uključenih u njihovu produkciju u LPS stimulisanim monocitima

	PGE ₂ -s	TXA ₂ -s
	<i>Pearsonovi koeficijenti - r</i>	
cPLA₂α	0.596	-0.295
COX-1	-0.366	-0.479
COX-2	-0.021	-0.166
mPGES-1	0.060	0.437
mPGES-2	0.400	0.711
cPGES	0.442	0.142
TXAS	0.319	0.273

Oznake: cPLA₂α - uticaj na ekspresiju mRNK cPLA₂α u LPS-stimulisanim monocitima, COX-1 - uticaj na ekspresiju mRNK COX-1 u LPS-stimulisanim monocitima, COX-2- uticaj na ekspresiju mRNK COX-2 u LPS-stimulisanim monocitima, cPGES- uticaj na ekspresiju mRNK cPGES u LPS-stimulisanim monocitima, mPGES-1- uticaj na ekspresiju mRNK mPGES-1 u LPS-stimulisanim monocitima, mPGES-2- uticaj na ekspresiju mRNK mPGES-2 u LPS-stimulisanim monocitima, TXAS- uticaj na ekspresiju mRNK TXAS u LPS-stimulisanim monocitima; PGE₂-s i TXA₂-s - uticaj na količinu produkovanog PGE₂ i TXA₂ u LPS-stimulisanim monocitima

Na osnovu prikazanih rezultata zapaža se umerena korelacija između uticaja bokvica na ekspresiju mRNK cPLA₂α, mPGES-2 i cPGES i produkcije PGE₂ u LPS-stimulisanim monocitima. U LPS-stimulisanim monocitima je uticaj na ekspresiju mRNK COX-1 i COX-2 enzima uključenih u produkciju oba analizirana metabolita arahidonske kiseline, u negativnoj korelaciji sa količinom produkovanih metabolita. Nedostatak direktne korelacije između ekspresije mRNK ključnih enzima i količine nastalih proizvoda implicira da mehanizam produkcije PGE₂ i TXA₂ zavisi i od inhibicije ekspresije, ali i inhibicije aktivnosti samih enzima. Izračunati su korelacioni faktori i između uticaja na produkciju PGE₂ i ekspresiju TXAS, kao i na produkciju TXA₂ i ekspresiju PGES jer rezultati nekih ranijih istraživanja pokazuju da ukoliko se inhibira jedna grana COX puta, povećava se produkcija drugih metabolita. Naime, na A549 ćelijskoj liniji pokazano je da selektivni inhibitor COX-2 (NS-398) snižava produkciju svih prostanodia, dok selektivni inhibitor mPGES-1 redukuje produkciju PGE₂, ali povećava produkciju TXA₂ i PGF₂α (Bergquist i sar., 2019). Na osnovu vrednosti prikazanih u Tabeli 6.14. ne može da se utvrdi veza između uticaja na ekspresiju RNK terminalnih enzima uključenih u produkciju PGE₂ i produkcije TXA₂, ili obrnuto.

Primenom analize glavnih komponenti ispitano je da li postoji grupisanje ekstrakata bokvica na osnovu aktivnosti koju su pokazali tokom testova na nestimulisanim i LPS-stimulisanim monocitima. PCA rezultati su prikazani na Slici 6.4. i u Tabeli 9.65. u Prilogu.



Slika 6.4. Analiza glavnih komponenti na osnovu ispoljene aktivnosti ekstrakata bokvica

a) doprinos varijabli na grafiku opterećenja (distribution of variables on loadings plot);

b) raspodela ekstrakata bokvica u zavisnosti od ispoljene aktivnosti

Oznake: (a) cPLA α - uticaj na ekspresiju mRNK cPLA α u LPS-stimulisanim monocitima, COX-1 - uticaj na ekspresiju mRNK COX-1 u LPS-stimulisanim monocitima, COX-2- uticaj na ekspresiju mRNK COX-2 u LPS-stimulisanim monocitima, cPGES- uticaj na ekspresiju mRNK cPGES u LPS-stimulisanim monocitima, mPGES-1- uticaj na ekspresiju mRNK mPGES-1 u LPS-stimulisanim monocitima, mPGES-2- uticaj na ekspresiju mRNK mPGES-2 u LPS-stimulisanim monocitima, TXAS- uticaj na ekspresiju mRNK TXAS u LPS-stimulisanim monocitima; PGE $_2$ i TXA $_2$ - uticaj na količinu produkovanog PGE $_2$ i TXA $_2$ u nestimulisanim monocitima, PGE $_2$ -s i TXA $_2$ -s - uticaj na količinu produkovanog PGE $_2$ i TXA $_2$ u LPS-stimulisanim monocitima (b) M - metanolni ekstrakt; V - vodeni ekstrakt; PAL - *P. altissima*; PAR - *P. argentea*; PHO - *P. holosteam*; PLA - *P. lanceolata*; PMA - *P. major*; PME - *P. media*.

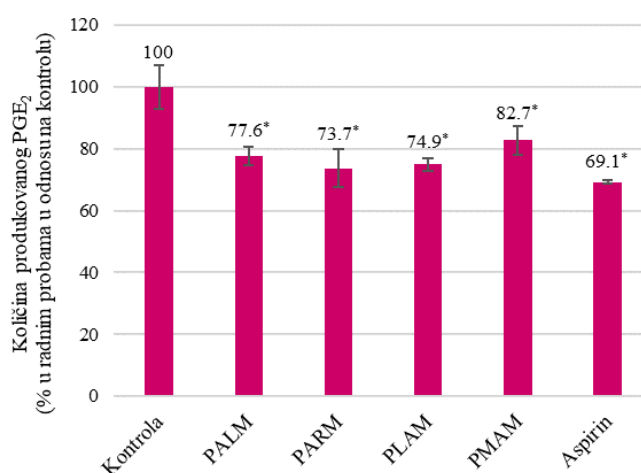
Prva dva faktora analize (F1 i F2) doprinose ukupnoj varijansi 54.2%. Na grafiku se uočava diferenciranje metanolnih, smeštenih u negativnom delu F1, i vodenih ekstrakata, lokalizovanih u pozitivnom delu F1. U donjem levom uglu grafika se izdvaja PALM, što je najverovatnije uzrokovano uticajem ovog ekstrakta na ekspresiju mRNK COX-2, mPGES-2, cPGES i TXAS i na produkciju PGE $_2$ i TXA $_2$ u LPS-stimulisanim monocitima. Osim PALM, i PMEM se izdvojio od drugih metanolnih ekstrakata. Ostali metanolni ekstrakti su locirani u pozitivnom delu F2, čemu doprinosi njihov uticaj na produkciju TXA $_2$ u stimulisanim i nestimulisanim monocitima. Među vodenim ekstraktima, koji su grupisani u donjem desnom delu, blago se izdvaja ekstrakt PALV (najaktivniji prema inhibiciji ekspresije mRNK COX-2).

Kao što je ranije rečeno, u ovoj disertaciji je fokus prilikom proučavanja uticaja bokvica na produkciju PGE $_2$ i TXA $_2$ bio na njihovom delovanju u monocitima. Treći model sistem korišćen u okviru ove disertacije su bili makrofage, koji su jedan od najčešće korišćenih *in vitro* model sistema inflamacije. U makrofagama dolazi do ekspresije COX-2, koja je dodatno snažno povećana dejstvom inflamatornih agenasa, kao što je LPS, što rezultuje povećanom produkcijom PGE $_2$ i TXA $_2$. Ključne faze nastajanja ovih proizvoda uključuju dominantno dejstvo COX-2, uz manji doprinos COX-1, a ovaj model sistem može da se koristi za ispitivanje sposobnosti uzoraka da inhibiraju inflamaciju tokom kasnijih faza inflamatornog odgovora, kada su monociti već transformisani u makrofage na mestima gde se ovi procesi inflamacije odvijaju.

U ovom model sistemu su analizirana četiri metanolna ekstrakta bokvica, dva ekstrakta vrste o čijem anti-inflamatornom delovanju od ranije postoje podaci u literaturi,

PMAM i PLAM i dva ekstrakta do sada veoma slabo ispitanih vrsta, PALM i PARM, koje su se izdvojile po uticaju na ekspresiju COX-2. Preciznije, PALM koji naj snažnije redukovao ekspresiju COX-2, i PARM koji je povećao ekspresiju COX-2. S obzirom da je na makrofagama analiziran efekat samo četiri metanolna ekstrakta bokvica, ovi rezultati nisu korišćeni za analizu glavnih komponenti.

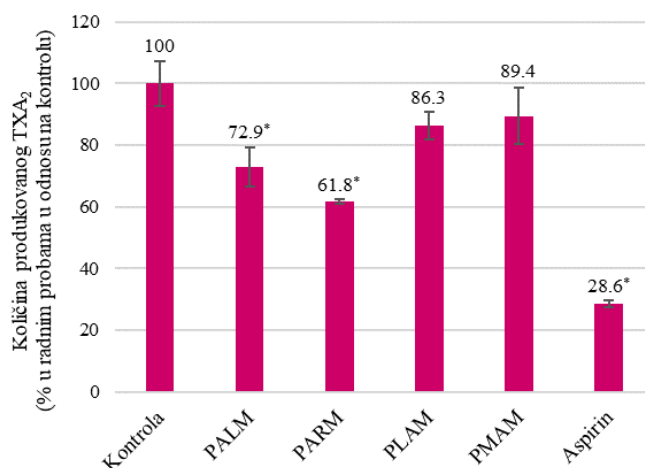
Na *Histogramu 6.20.* prikazan je uticaj metanolnih ekstrakata vrsta PALM, PARV, PLAM i PMAM na produkciju PGE₂ u makrofagama u kojima je inflamacija izazvana dodatkom LPS. Osim ekstrakata, prikazana je i aktivnost standardnog inhibitora ciklooksigenaza, aspirina, korišćenog pri koncentraciji od 25 µmol/L (4.50 µg/mL).



Histogram 6.20. Uticaj metanolnih ekstrakata bokvica[‡] i aspirina[£] na produkciju PGE₂[§] u LPS-stimulisanim makrofagama

Oznake: M - metanolni ekstrakt; PAL - *P. altissima*; PAR - *P. argentea*; PLA - *P. lanceolata*; PMA - *P. major*; * statistički značajno različito od kontrole ($p \leq 0.05$); [‡] koncentracija ekstrakata 450 µg/mL; [£] koncentracija aspirina 25 µmol/L (4.50 µg/mL); [§] Količina produkovanog PGE₂ (%) predstavlja odnos površine pikova PGE₂ i internog standarda PGB₂ u radnim probama i površine pikova PGE₂ i PGB₂ u kontroli.

Na osnovu rezultata prikazanih na *Histogramu 6.20.* uočava se da su svi ekstrakti ispoljili inhibiciju produkcije PGE₂, ali da imaju slabiju aktivnost u odnosu na aspirin primenjen pri 100 puta manjoj koncentraciji. U odnosu na aktivnost koju su ekstrakti pokazali na monocitima stimulisanim LPS, u makrofagama su ispoljili malo slabiji potencijal. Takođe, uočavaju se razlike i u efektima bokvica na produkciju TXA₂ u LPS-stimulisanim monocitima (*Histogram 6.15.*) i makrofagama (*Histogram 6.21.*).



Histogram 6.21. Uticaj* metanolnih ekstrakata bokvica[‡] i aspirina[£] na produkciju TXA₂[§] u LPS-stimulisanim makrofagama

Oznake: M - metanolni ekstrakt; PAL - *P. altissima*; PAR - *P. argentea*; PLA - *P. lanceolata*; PMA - *P. major*; * statistički značajno različito od kontrole ($p \leq 0.05$); [‡] koncentracija ekstrakata 450 $\mu\text{g/mL}$; [£] koncentracija aspirina 25 $\mu\text{mol/L}$ (4.50 $\mu\text{g/mL}$). [§] Količina produkovanog TXA₂ (%) predstavlja odnos površine pikova TXA₂ i internog standarda PGB₂ u radnim probama i površine pikova TXA₂ i PGB₂ u kontroli

Na osnovu prikazanih rezultata uočava se da PLAM i PMAM nisu statistički značajno smanjili produkciju TXA₂ u makrofagama, iako su na monocitima ispoljili veoma dobru aktivnost. Sa druge strane, uzorak PARM koji je na monocitima bio najmanje aktivan u makrofagama najviše supresuje produkciju TXA₂.

Na osnovu svih prikazanih rezultata, postoje indicije da navedeni ekstrakti ne deluju prvenstveno kao inhibitori aktivnosti enzima, jer da deluju, odnos između ispoljene aktivnosti u različitim model sistemima bi bio sličan, s obzirom da je struktura enzima ista u svim model sistemima. Pretpostavlja se da bokvice deluju i nekim drugim mehanizmima na produkciju ovih lipidnih medijatora, a neophodna su dalja ispitivanja kako bi se utvrdilo sa kojim tačno signalnim kaskadama intereaguju. Iako je u ovom radu ispitan uticaj na ekspresiju mRNK enzima koji su uključeni u produkciju PGE₂ i TXA₂, nije ispitan efekat na enzime uključene u degradaciju PGE₂, kao ni na ekspresiju receptora i interakciju ovih lipidnih medijatora sa receptorima, a sve navedeno u velikoj meri utiče na količinu i aktivnost detektovanih metabolita, odnosno na potencijalnu anti-inflamatornu aktivnost bokvica.

U dosadašnjim studijama je uticaj bokvica na metabolizam arahidonske kiseline najčešće ispitan u okviru evaluacije anti-inflamatornog delovanja, pri čemu je fokus bio na ispitivanju modulacije produkcije PGE₂ i ekspresije COX-2. U radu Vigo i saradnika (2005) prikazano je da ekstrakt cele biljke *P. lanceolata*, dobijen iz suvog materijala ekstrakcijom pomoću smeše etanola i vode (45:55), ne utiče na produkciju PGE₂ u mišijim makrofagama pri koncentraciji 84 $\mu\text{g/mL}$, da blago smanjuju ekspresiju mRNK COX-1 i povećavaju ekspresiju mRNK COX-2, ali da se ni jedan od navedenih efekata nije statistički značajno razlikovao od kontrole. Sa druge strane, metanolni ekstrakti semena vrsta *P. major* i *P. lanceolata* (100 $\mu\text{g/mL}$) su statistički značajno redukovali ekspresiju mRNK COX-2 u RAW264.7 mišijim makrofagama, pri čemu su uzorci sa različitih lokacija imali različitu aktivnost (Zhou i sar., 2013). Ekstrakti vrste *P.*

major su korišćeni za izolovanje triterpenskih kiselina koje su ispoljile COX-1 i COX-2 inhibitornu aktivnost (Ringbom i sar., 1998; Stenholm i sar., 2012). U studiji u kojoj su analizirani različiti ekstrakti *P. lanceolata* kao inhibitori izolovanih COX-1 i COX-2 enzima, acetatni i heksanski ekstrakti su bolje inhibirali COX-2, a etilacetatni ekstrakt COX-1. Heksanski ekstrakt je pokazao najveću selektivnost ka inhibiciji COX-2 ($IC_{50}=1.96 \mu\text{g/mL}$) u odnosu na COX-1 ($IC_{50}=69 \mu\text{g/mL}$; Ondua i sar., 2016). Nasuprot tome, frakcija dihlormetanskog ekstrakta lista *P. lanceolata* koja nije rastvorna u heksanu je ispoljila selektivnost ka inhibiciji COX-1 u odnosu na COX-2 (IC_{50} 8.13 i 35.3 $\mu\text{g/mL}$, redom; Fakhrudin i sar., 2017). Fakhrudin i saradnici (2017) su i *in vivo* ispitivali anti-inflamatorni potencijal navedenog uzorka i utvrdili da on inhibira ekspresiju COX-2. *Verbascox*[®], preparat pripremljen od ekstrakata vrsta *P. lanceolata* i *L. citriodora* smanjuje produkciju PGE_2 i ekspresiju mRNK COX-2 u humanim neutrofilima, a ne utiče na ekspresiju COX-1 (Nannoni i sar., 2020b). Anti-inflamatorna aktivnost vrste *P. holosteum* bila je predmet proučavanja samo jedne skorašnje studije u kojoj je pokazano da ekstrakti ove vrste inhibiraju produkciju PGE_2 u RAW264.7 makrofagama, a frakcije različite polarnosti imaju različit intenzitet delovanja (Genc i sar., 2019).

Takođe, izučavan je i uticaj bokvica na NF- κ B signalnu kaskadu kojom se aktivira veliki broj proinflamatornih medijatora. Dihlormetanski ekstrakti lista *P. lanceolata* su ispoljili bolju inhibiciju NF- κ B signalne kaskade od metanolnih ekstrakata (Vogl i sar., 2013), dok su i etanolni i vodeni ekstrakti listova *P. major* bili aktivni, ali se u zavisnosti od primenjenih koncentracija razlikovao i odnos njihove aktivnosti (Zubair i sar., 2019).

Sve navedeno svedoči da mnogo faktora određuje intenzitet antiinflamatornog delovanja bokvica. Poznato je da je aktivnost biljnih ekstrakata uslovljena njihovim hemijskim sastavom. U cilju određivanja eventualne korelacije između hemijskog profila ekstrakata i ispitane aktivnosti, izračunati su *Pearsonovi* koeficijenti korelacije između sadržaja ukupnih polifenola, flavonoida i tanina, kao i jedinjenja koja su se, nakon analize hemijskog sastava izdvojila kao dominantna, i količine produkovanih PGE_2 i TXA_2 (Tabela 6.15.).

Tabela 6.15. Pearsonovi koeficijenti korelacije između sadržaja ukupnih polifenola, flavonoida i tanina, kao i jedinjenja koja su se izdvojila analizom hemijskog sastava, i uticaja na produkciju PGE₂ i TXA₂

	PGE ₂	TXA ₂	PGE ₂ -s	TXA ₂ -s	PGE ₂ -MF	TXA ₂ -MF	cPLA ₂ α	COX-1	COX-2	mPGES-1	mPGES-2	cPGES	TXAS
<i>Pearsonovi koeficijenti - r</i>													
Ukupni polienoli	0.15	0.24	0.50	0.01	0.52	0.95	-0.03	-0.54	-0.35	-0.37	0.18	0.27	-0.25
Ukupni flavonoidi	-0.04	0.15	0.41	-0.12	0.49	0.92	-0.07	-0.60	-0.26	-0.16	0.11	0.12	-0.25
Ukupni tanini	0.15	0.15	0.52	-0.01	0.40	0.89	-0.12	-0.54	-0.16	-0.36	0.25	0.34	-0.21
Hlorogenska kiselina	0.33	-0.21	-0.20	-0.21	0.12	-0.65	-0.33	0.11	-0.34	-0.44	-0.11	0.00	-0.48
Kafena kiselina	-0.23	0.26	0.06	0.22	-0.45	0.14	0.34	0.08	-0.33	0.44	-0.07	-0.29	-0.13
Vanilinska kiselina	0.54	-0.14	0.01	-0.13	0.09	0.73	-0.36	-0.35	-0.35	-0.37	0.18	0.14	-0.34
Akteozid	-0.11	-0.08	-0.27	-0.23	-0.03	0.65	0.29	0.38	-0.26	0.31	-0.18	-0.38	-0.13
Apigenin	-0.20	0.08	-0.40	0.01	0.75	0.21	-0.37	-0.27	-0.38	-0.07	-0.10	0.20	0.13
Apigenin-7-O-glukozid	-0.25	-0.28	0.26	0.03	-0.18	-0.05	-0.03	0.06	0.70	-0.03	0.55	0.38	0.79
Luteolin	0.37	0.01	0.19	0.05	-0.85	-0.68	-0.28	-0.20	-0.34	-0.49	0.15	0.45	-0.29
Luteolin-7-O-glukozid	0.04	-0.03	-0.28	0.21	-0.95	-0.62	-0.13	0.33	-0.22	0.02	-0.13	-0.30	-0.25
Ursolna kiselina	-0.33	-0.16	-0.46	-0.17	0.62	1.00	-0.34	-0.24	-0.03	0.06	0.01	0.05	0.43
Katalpol	0.59	-0.22	-0.16	-0.10	0.39	-0.46	-0.50	-0.23	-0.19	-0.48	0.08	0.12	-0.32
Aukubin	-0.08	0.20	-0.33	-0.17	0.85	0.56	-0.01	-0.28	-0.59	0.16	-0.21	-0.19	-0.09

Oznake: cPLA₂α - uticaj na ekspresiju mRNK cPLA₂α u LPS-stimulisanim monocitima, COX-1 - uticaj na ekspresiju mRNK COX-1 u LPS-stimulisanim monocitima, COX-2 - uticaj na ekspresiju mRNK COX-2 u LPS-stimulisanim monocitima, cPGES - uticaj na ekspresiju mRNK cPGES u LPS-stimulisanim monocitima, mPGES-1 - uticaj na ekspresiju mRNK mPGES-1 u LPS-stimulisanim monocitima, mPGES-2 - uticaj na ekspresiju mRNK mPGES-2 u LPS-stimulisanim monocitima, TXAS - uticaj na ekspresiju mRNK TXAS u LPS-stimulisanim monocitima; PGE₂ i TXA₂ - uticaj na količinu produkovanog PGE₂ i TXA₂ u nestimulisanim monocitima, PGE₂-s i TXA₂-s - uticaj na količinu produkovanog PGE₂ i TXA₂ u LPS-stimulisanim monocitima, PGE₂-MF i TXA₂-MF - uticaj na količinu produkovanog PGE₂ i TXA₂ u LPS-stimulisanim makrofagama;

Na osnovu koeficijenata prikazanih u *Tabeli 6.15.*, uočava se najveća povezanost između hemijskog sastava i uticaja na produkciju PGE₂ i TXA₂ u makrofagama. Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i tanina je u direktnoj korelaciji sa ispoljenim potencijalom inhibicije produkcije TXA₂, i umerenoj korelaciji sa uticajem na produkciju PGE₂ u makrofagama. Uočava se direktna pozitivna korelacija između sadržaja ursolne kiseline i redukcije TXA₂ u makrofagama, kao i visoke vrednosti *Pearsonovih* faktora između sadržaja aukubina, apigenina i ursolne kiseline i redukcije PGE₂ u makrofagama. U ovom model sistemu je aktivnost COX-2 dominantna, a od ranije je poznato da ursolna kiselina (Ringbom i sar., 1998) i aukubin (Park i sar., 2010) imaju veći afinitet ka inhibiciji COX-2, nego COX-1. Sa druge strane, prisutna je negativna korelacija između sadržaja luteolina i luteolin-7-*O*-glukozida i sposobnosti inhibicije produkcije PGE₂, i u nešto manjoj meri TXA₂ u makrofagama. Međutim, neophodno je napomenuti da ovako visok stepen i pozitivne i negativne korelacije može da bude i posledica malog broja uzoraka (4) koji su analizirani u makrofagama.

Zanimljivo je da se pretežno uočava negativna korelacija između hemijskog sastava i uticaja na ekspresiju mRNK enzima koji su uključeni i u produkciju PGE₂ i u produkciju TXA₂. Na primer, postoji umerena negativna korelacija između sadržaja katalpola (-0.50) i uticaja na ekspresiju cPLA₂α. Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida je u umerenoj negativnoj korelaciji sa uticajem na ekspresiju mRNK COX-1, a od svih analiziranih jedinjenja jedino je sadržaj akteozida i luteolin-7-*O*-glukozida u slaboj pozitivnoj korelaciji sa navedenim delovanjem. Kada je reč o sposobnosti inhibicije ekspresije COX-2 uočava se najveća korelacija sa sadržajem apigenin-7-*O*-glukozida (r=0.70). Takođe, sadržaj apigenin-7-*O*-glukozida je u visokoj korelaciji sa potencijalom smanjenja ekspresije TXAS, i u manjoj meri mPGES-2 i cPGES.

U pogledu korelacionih faktora hemijskog sastava i uticaja na produkciju analiziranih metabolita arahidonske kiseline u monocitima, uočava se umerena pozitivna korelacija između sadržaja vanilinske kiseline i katalpola, odnosno sadržaja ukupnih polifenola, flavonoida i tanina i sposobnosti inhibicije produkcije PGE₂ u nestimulisanim i stimulisanim monocitima, redom. Sa druge strane, ne uočava se korelacija između hemijskog sastava i efekta na produkciju TXA₂, jer su najveći korelacioni faktori dobijeni sa sadržajem kafene kiseline (0.26 i 0.22) i dalje zanemarljivi.

Prema nama dostupnim podacima, u okviru ove doktorske disertacije je prvi put ispitan uticaj vrsta *P. argentea* i *P. media* na produkciju PGE₂ i TXA₂ u inflamatornim procesima. Takođe, *P. altissima*, koja je najviše supresovala ekspresiju COX-2, prethodno je analizirana samo kao inhibitor COX-1 i 12-LOX enzima (Beara i sar., 2012). Takođe, po našim saznanjima, prvi put je ispitan uticaj ekstrakata bokvica na ekspresiju terminalnih enzima ciklooksigenaznog puta uključenih u produkciju PGE₂ i TXA₂. Prikazani rezultati doprinose rasvetljavanju mehanizama anti-inflamatornog delovanja bokvica, a jedan deo ovih rezultata je i objavljen u publikaciji iz 2020. godine (Majkić i sar., 2020). Posebno su značajni rezultati ispitivanja vodenih ekstrakata, jer pokazuju da i u formi u kojoj se ove biljne vrste upotrebljavaju u tradicionalnoj medicini i svakodnevnom životu (čaj-infuz), one mogu da ispolje anti-inflamatorno delovanje. Međutim, ne sme se zanemariti činjenica da jedinjenja prisutna u čaju podležu promenama tokom digestije, te da se u krvi ne nalaze hemijski istovetne strukture onima

koje su analizirane u okviru ove doktorske disertacije. Stoga, jedna od narednih faza daljih ispitivanja zasigurno treba da predstavlja ispitivanje digestata navedenih čajeva.

6.4. Merlot vina kao modulatori produkcije PGE₂ i TXA₂

U ovom radu je analiziran polifenolni sastav i anti-inflamatorni potencijal 17 *Merlot* vina koja su u periodu od februara do oktobra 2017. godine bila komercijalno dostupna u Novom Sadu: 12 *Merlot* vina proizvedenih u Vojvodini, i po jedno iz Francuske, Italije, Makedonije, Slovenije i Španije. Iako u Vojvodini postoji duga tradicija uzgajanja grožđa i proizvodnje vina, vojvođanska vina su tek proteklih nekoliko godina privukla ozbiljniju pažnju naučnika. Na osnovu publikovanih rezultata (Beara i sar., 2017), može se zaključiti da se *Merlot* vino izdvojilo kao vino koje odlikuje dobra *in vitro* biološka aktivnost, prvenstveno antioksidantni potencijal. Sa druge strane, *Merlot* vina su jedna od najpoznatijih vina u svetu i bila su predmet istraživanja naučnika od Novog Zelanda do Argentine. Zbog značaja polifenolnih jedinjenja kako za biološku aktivnost, tako i za kvalitet vina, okarakterisan je polifenolni sastav velikog broja *Merlot* vina sa različitih područja.

U okviru ove disertacije, spektrofotometrijskim metodama je određen sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida, tanina i antocijana, a zatim je primenom HPLC-UV/VIS tehnike određen sadržaj odabranih polifenolnih jedinjenja (9 fenolnih kiselina, 6 flavonoida, 1 stilbena, 5 antocijanina; Majkić i sar., 2019).

6.4.1. Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida, tanina i antocijana u uzorcima *Merlot* vina

Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida, tanina i monomernih antocijana određen je spektrofotometrijski, po procedurama opisanim u *Poglavlju 5.3.1-5.3.3.*, a dobijeni rezultati su prikazani u *Tabeli 6.16.*

Tabela 6.16. Sadržaj* ukupnih polifenola, flavonoida, tanina i antocijana u uzorcima
Merlot vina

	Sadržaj ukupnih polifenola ^c	Sadržaj ukupnih flavonoida	Sadržaj ukupnih tanina		Sadržaj ukupnih monomernih antocijana
Uzorak	mg GKE/L vina	mg KvE/L vina	mg KE/ L vina	% tanina u polifenolima	mg ME/L vina
M-1	1260 ± 32.3 ^{ij}	37.9 ± 0.67 ^d	502 ± 13.2 ^f	40.2	25.4 ± 0.17 ^{c,d}
M-2	1345 ± 114 ^{h,i,j}	20.4 ± 1.05 ^{ij}	351 ± 19.8 ^g	29.2	19.9 ± 1.54 ^{c,d}
M-3	1436 ± 95.2 ^{f,g,h}	49.9 ± 1.00 ^c	357 ± 11.3 ^g	24.8	79.9 ± 1.22 ^{a,b}
M-4	1893 ± 111 ^{a,b}	54.6 ± 2.79 ^{b,c}	948 ± 40.4 ^c	49.7	16.9 ± 1.21 ^{c,d}
M-5	1515 ± 140 ^{e,f,g}	21.8 ± 1.76 ^{h,i,j}	260 ± 17.6 ^g	17.4	35.9 ± 1.70 ^{c,d}
M-6	1407 ± 108 ^{f,g,h,i}	31.3 ± 2.68 ^{d,e,f}	481 ± 29.6 ^f	34.8	28.5 ± 1.03 ^{c,d}
M-7	1558 ± 105 ^{d,e,f}	29.9 ± 2.91 ^{e,f,g}	608 ± 46.6 ^e	42.3	13.3 ± 0.63 ^{c,d}
M-8	1384 ± 101 ^{g,h,i}	25.5 ± 2.38 ^{f,g,h}	824 ± 46.6 ^d	24.8	40.3 ± 1.80 ^{c,d}
M-9	780.2 ± 60.6 ^k	23.5 ± 0.13 ^{g,h,i}	304 ± 6.07 ^g	41.1	12.1 ± 0.27 ^{c,d}
M-10	1691 ± 135 ^{c,d}	16.1 ± 0.51 ^j	574 ± 23.2 ^{e,f}	34.6	21.1 ± 0.69 ^{c,d}
M-11	1182 ± 117 ^j	17.5 ± 1.77 ^{ij}	496 ± 29.9 ^f	43.2	46.1 ± 1.79 ^{b,c}
M-12	1639 ± 140 ^{c,d,e}	20.5 ± 0.10 ^{h,i,j}	512 ± 36.0 ^{e,f}	37.7	7.99 ± 0.37 ^d
MFR	2004 ± 109 ^a	67.3 ± 3.54 ^a	1065 ± 64.9 ^b	59.9	86.3 ± 10.5 ^a
MIT	1180 ± 21.8 ^j	36.5 ± 2.72 ^{d,e}	563 ± 0.94 ^{e,f}	52.2	32.8 ± 2.02 ^{c,d}
MMA	2022 ± 124 ^a	59.5 ± 2.92 ^b	782 ± 26.9 ^d	43.5	33.4 ± 2.09 ^{c,d}
MSL	1772 ± 173 ^{b,c}	57.1 ± 3.72 ^b	1251 ± 121 ^a	80.1	16.6 ± 1.41 ^{c,d}
MSP	1859 ± 133 ^{a,b}	68.9 ± 5.30 ^a	946 ± 29.8 ^c	57.8	24.6 ± 2.06 ^{c,d}

Oznake: M-1 do M-12 *Merlot* vina iz Srbije; MFR - *Merlot* vino iz Francuske; MIT - *Merlot* vino iz Italije; MMA - *Merlot* vino iz Makedonije; MSL - *Merlot* vino iz Slovenije; MSP - *Merlot* vino iz Španije; *vrednosti prikazane u tabeli su srednja vrednost tri merenja ± standardna devijacija; ^aRazličita slova (a-k) u eksponentu u istoj koloni table ukazuju na statistički značajnu razliku između vrednosti, pri nivou značajnosti od ≤ 0.05 (na osnovu post-hoc Tukey-evog HSD testa).

Sadržaj ukupnih polifenola određen je spektrofotometrijskom metodom uz upotrebu *Folin-Cicolateovog* reagensa. Ovo je jedna od najčešće primenjivanih metoda za određivanje sadržaja polifenolnih jedinjenja u različitim biljnim uzorcima, uključujući i vina. Međutim, osim sa polifenolnim jedinjenjima, FC reagens može da reaguje i sa nekim drugim komponentama (askorbatima, redukujućim šećerima, sulfatima). S obzirom da se sulfati dodaju kao konzervansi u vina, moguće je da je sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u vinima niži od onog određenog primenom ove metode (Šeruga i sar., 2013).

Sadržaj ukupnih polifenola je izražena u miligramima ekvivalenata galne kiseline koje sadrži jedan litar vina (mg GKE/L). Sadržaj ukupnih polifenola varira od 780.2 mg GKE/L, detektovano u uzorku M9, do 2004 i 2022 mg GKE/L koliko se nalazilo u francuskom, odnosno makedonskom *Merlot* vinu, koje su bila najbogatija ovim sekundarnim metabolitima. Ukoliko se izuzme uzorak M9, može se uočiti da se po sadržaju ukupnih polifenolnih jedinjenja vojvođanska vina ne razlikuju u velikoj meri od evropskih *Merlot* vina prisutnih na tržištu Novog Sada.

Mitić i saradnici (2014) su analizirali polifenolni sastav i antioksidantni potencijal nekoliko vina poreklom iz Srbije i Makedonije, uključujući i *Merlot* vino iz Subotice. Ispitivano vino sadržalo je 2620 mg GKE/L što je znatno više od sadržaja polifenolnih jedinjenja detektovanih u subotičkim vinima (M4 i M6) analiziranim u okviru ove disertacije. Sa druge strane, sadržaj određen u makedonskom vinu je skoro identičan

rezultatima prethodnih istraživanja (1982–2469 mg GKE/L, Dimitrovska i sar., 2013; 1918–2564 mg GKE/L, Ivanova-Petropulos i sar., 2015b).

Ukoliko se uporede rezultati prikazani u *Tabeli 6.16.* sa sadržajem polifenola u *Merlot* vinima iz drugih regija, može se zaključiti da brazilska (2692–2813 mg GKE/L, Gris i sar., 2013) i australijska (1886–3610 mg GKE/L, Ginjom i sar., 2010) *Merlot* vina karakteriše veći sadržaj polifenolnih jedinjenja, pri čemu se mogu uočiti velike varijacije između analiziranih vina. Sa druge strane, detektovan sadržaj polifenolnih jedinjenja je u skladu sa sadržajem detektovanim u turskim (1480–1720 mg GKE/L, Anli i Vural, 2009), francuskim (1243–2419 mg GKE/L, Chira i sar., 2011) i istarskim *Merlot* vinima (1260 mg GKE/L, Šeruga i sar., 2011).

U pogledu ukupnih flavonoida, izraženih u miligramima ekvivalenata kvercetina koje sadrži jedan litar vina (mg KvE/L), po visokom sadržaju izdvajaju se špansko (68.9 mg KvE/L) i francusko vino (67.3 mg KvE/L), dok je približno četiri puta niži sadržaj detektovan u vojvođanskim uzorcima M10 i M11 (16.1 odnosno 17.5 mg KvE/L). Međutim, prilikom tumačenja rezultata dobijenih primenom metode Chang i saradnika iz 2002. godine (*Poglavlje 5.3.2.*), neophodno je uzeti u obzir činjenicu da stabilan kompleks sa aluminijum-hloridom grade flavonoidi koji pored C-4 keto grupe imaju i hidroksilnu grupu u položaju C-3 ili C-5, dok labilne komplekse aluminijum hlorid gradi sa orthodihidroksil grupama u A- ili B-prstenu flavonoida. Međutim, jedna od dominantnih klasa flavonoida prisutnih u vinima, flavan-3-oli, ne mogu da se detektuju ovom metodom. Ginjom i saradnici (2010) su koristili navedenu metodu za određivanje sadržaja flavonola u australijskim vinima, smatrajući da flavanoni i flavoni nisu zastupljene klase flavonoida u vinima. Oni su u australijskim *Merlot* vinima detektovali sadržaj u opsegu od 0 do 32 mg KvE/L.

Slovenačko (1251 mg KE/L) i francusko vino (1065 mg KE/L) se izdvajaju po visokom sadržaju tanina (miligram ekvivalenata katehina koje sadrži jedan litar vina), dok uzorak M5 (260 mg KE/L) karakteriše najniža koncentracija ovih komponenti. Najstarije od ispitanih vina je bilo vino M4, berba iz 2008 godine. Upravo ovo vino je taninima najbogatije vojvođansko vino, odnosno samo su vina iz Slovenije i Francuske sadržala više ovih komponenti. Sa druge strane, nizak sadržaj tanina detektovan u uzorku M5 se ne može povezati sa starošću vina, jer je M5 berba iz 2011., odnosno jedno je od najstarijih analiziranih vina. Moguće da je proces vinifikacije, odnosno vremenski period tokom kojeg se odvijala fermentacija sa pokožicom i semenom grožđa, bio presudan za ovako nizak sadržaj tanina, jer je veći sadržaj tanina u korelaciji sa dužim vremenom ekstrakcije. Takođe, na sadržaj tanina može da utiče i vrsta suda u kom se čuva vino (Stavridou i sar., 2016).

Pošto je sadržaj tanina određen kao razlika ukupnih polifenola pre i posle taloženja tanina, moguće je izračunati procentualni udeo tanina u ukupnim polifenolima (*Tabela 6.16.*). Kao što se vidi iz priložene tabele, varijacije procentualnog udela tanina između vina su izuzetno velike. Naime, u uzorku M5 vojvođanskih vina, tanini čine manje od jedne petine ukupnih polifenolnih jedinjenja, dok sa druge strane, u slovenačkom *Merlot* vinu, tanini čine čak četiri petine ukupnih polifenolnih jedinjenja. S obzirom da su tanini jedna od klasa polifenolnih jedinjenja koja najviše doprinosi ukusu vina, odnosno, ove

komponente deluju adstringentno usled čega vino ima opor ukus, može da se pretpostavi da će uzorci francuskog, slovenačkog, španskog vina, kao i vojvođansko vino M4, imati mnogo oporiji ukus u odnosu na većinu ostalih analiziranih vojvođanskih vina.

Ukoliko se upoređi sadržaj tanina sa literaturnim podacima, može se zaključiti da je u australijskim vinima udeo tanina u polifenolnim jedinjenjima oko 50%, što je u skladu sa podacima prikazanim u *Tabeli 6.16.* (Ginjom i sar., 2010).

Antocijani doprinose estetskim karakteristikama vina, jer upravo ova klasa polifenolnih jedinjenje određuje boju vina. U okviru ovog rada ispitan je sadržaj ukupnih monomernih antocijana pH diferencijalnom metodom, koja se zasniva na osobini antocijana da pri pH 1 budu crveno obojeni, dok su pri pH 4.5 bezbojni. Ova metoda nije pogodna za određivanje proizvoda koji nastaju usled degradacije ili polimerizacije antocijana, što svakako jesu procesi koji se odigravaju tokom starenja vina. Rezultati su izraženi kao miligram ekvivalenata malvidin-3-*O*-glukozida, dominantnog antocijana u vinu, koji se nalazi u jednoj litri vina (ME/L). Najbogatije antocijanima je bilo francusko *Merlot* vino (86.3 mg ME/L), a neznatno niži sadržaj detektovan je u vojvođanskom vinu M3 (79.9 mg ME/L). Sva druga vina su imala mnogo nižu količinu antocijana, a po najnižem sadržaju antocijana izdvaja se uzorak M12 (7.99 mg ME/L). Rezultati prethodnih studija svedoče da nakon završetka fermentacije sadržaj monomernih antocijana opada, a raste sadržaj polimernih antocijana (Ginjom i sar., 2010). Takođe, i u nekoliko drugih studija u kojima su analizirana vina različitih godina berbe i proizvodnje, uočeno je da se sa odležavanjem vina smanjuje sadržaj monomernih antocijana (Chira i sar., 2011; Dimitrovska i sar., 2013; Gris i sar., 2013). U skladu sa ovim podacima može da se pretpostavi da u je uzorcima M4, M7, M12 i MSL detektovan niži sadržaj monomernih antocijana, jer je tokom godina došlo do njihove polimerizacije. Međutim, uzorak M5 ponovo predstavlja izuzetak, jer iako je vino iz 2011. godine, nalazi se među bogatijim vinima po sastavu monomernih antocijana. Sa druge strane, uzorak M9, koji je relativno mlado vino u momentu testiranja, sadrži malo monomernih antocijana, ali ima i najniži sadržaj ukupnih polifenola.

Rezultati prethodnih istraživanja pokazuju da je sadržaj ukupnih monomernih antocijana u *Merlot* vinu iz Subotice 38.8 mg ME/L vina (Mitić i sar., 2014), što je veći sadržaj od sadržaja antocijana detektovanih u M4 i M6. Australijska *Merlot* vina su znatno bogatija monomernim antocijanima u odnosu na srpska vina, a sadrže između 58 i 211 mg ME/L (Ginjom i sar., 2010).

Na samom početku, očekivane su manje razlike u sadržaju analiziranih klasa polifenolnih jedinjenja, jer su ispitivana vina dobijena od iste sorte grožđa. Međutim, sadržaj polifenolnih jedinjenja u vinu zavisi kako od sorte grožđa, tako i od sastava zemljišta na kome je loza gajena, klimatskih faktora, faze zrenja ploda, procesa vinifikacije, ali i starosti vina. Ukoliko se pogleda *Tabela 5.5.* u kojoj su prikazani podaci o vinima, odmah se mogu uočiti razlike u vinarskoj praksi. Naime, većina vina je flaširana godinu ili dve nakon berbe, dok su uzorci vina M12 i M8 flaširana četiri, odnosno osam godina nakon berbe. Uzorci M2, M3, M8 i M9 potiču od grožđa iz fruškogorskog vinogorja, pri čemu je godina berbe (2015) i flaširanja ista (2016), ipak uočavaju se znatne razlike u sadržaju svih klasa polifenolnih jedinjenja što govori da sam proces vinifikacije može da ima ključnu ulogu. Daudt i Fogaça (2013) su analizirali

uticaj različitih procesa vinifikacije na sadržaj ukupnih polifenola, tanina i antocijana u uzorcima iz različitih regiona Brazila. Varirali su vreme maceracije (fermentacije u prisustvu pokožice) kao i vrstu fermentacije (u prisustvu celih bobica ili samo pokožice grožđa). Na osnovu dobijenih rezultata zaključili su da je region presudan za sadržaj polifenolnih jedinjenja. Produženo vreme maceracije rezultovalo je povećanim sadržajem polifenola i tanina, dok su efekti na sadržaj antocijana bili različiti u zavisnosti od regiona (Daudt i Fogaça, 2013). Nasuprot tome, u radu Ginjoma i saradnika iz 2010. godine, nisu uočene razlike u sadržaju polifenolnih jedinjenja u zavisnosti od lokacije i godine proizvodnje, međutim i oni sami navode da bi analizom velikog broja uzoraka mogli da se dobiju drugačiji rezultati. Rezultati analize francuskih vina pokazuju da je sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja, antocijana i tanina u obrnutoj korelaciji sa starošću vina, ali u direktnoj korelaciji sa sadržajem alkohola (Chira i sar., 2011). Navedeni podaci potvrđuju da polifenolni profil vina zavisi od mnogobrojnih faktora.

Uopšteno, iako ove spektrofotometrijske metode nisu dovoljno specifične, rezultati ovih ispitivanja pokazuju da francusko vino odlikuje visok sadržaj sve četiri klase analiziranih polifenolnih jedinjenja. Naime, najbogatije polifenolnim jedinjenjima bilo je francusko i makedonsko (2004 i 2022 mg GKE/L), taninima slovenačko (1251 mg KE/L) i francusko (1065 mg KE/L), a flavonoidima špansko (68.9 mg KvE/L) i francusko *Merlot* vino (67.3 mg KvE/L). Po visokom sadržaju antocijana uz francusko *Merlot* vino (86.3 mg ME/L), izdvojilo se i vojvođansko vino M3 (79.9 mg ME/L). Od vojvođanskih vina, u uzorku M4 detektovane su najveće koncentracije polifenola, tanina i flavonoida, dok je sadržaj antocijana bio nizak.

6.4.2. Sadržaj odabranih polifenolnih jedinjenja u uzorcima *Merlot* vina

Iako su spektrofotometrijske metode veoma često korišćene, usled navedenih nedostataka i nedovoljne specifičnosti, ove metode mogu da se koriste samo za preliminarna proučavanja polifenolnog sastava. U cilju detaljnije evaluacije polifenolnog profila koja bi mogla da ukaže na razlike na osnovu kojih bi mogla da se klasifikuju vojvođanska vina u odnosu na vina iz drugih regiona, u saradnji sa dr Ljiljom Torović, redovnim profesorom Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, urađena je kvantitativna analiza odabranih polifenolnih komponenti primenom tečne hromatografije visokih performansi sa UV/VIS detektorom (*Poglavlje 5.3.5.1.*).

Analizirano je prisustvo devet fenolnih kiselina, od toga pet hidroksibenzoevih (galna, vanilinska, benzoeva, 4-hidroksibenzoeva, siringinska) i četiri hidroksicimentne kiseline (hlorogenska, kafena, *p*-kumarinska, *t*-cimetna). Koncentracije detektovanih kiselina prikazane su u *Tabeli 6.17.*

Tabela 6.17. Koncentracija * detektovanih[§] fenolnih kiselina u uzorcima Merlot vina

Fenolne kiseline (mg/L) [‡]							
Uzorak	Galna kiselina	Vanilinska kiselina	Kafena kiselina	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	Siringinska kiselina	Benzoeva kiselina	<i>t</i> -Cimetna kiselina
M-1	34.9 ± 0.65 ^f	Nd [‡]	5.54 ± 0.11 ^e	2.41 ± 0.07 ^f	0.79 ± 0.01 ^g	3.08 ± 0.13 ^f	1.95 ± 0.05 ^b
M-2	39.4 ± 0.91 ^e	Nd	4.27 ± 0.22 ^f	1.51 ± 0.04 ^j	0.18 ± 0.01 ^h	3.89 ± 0.06 ^c	0.58 ± 0.01 ^e
M-3	20.4 ± 0.17 ⁱ	Nd	4.01 ± 0.14 ^g	3.05 ± 0.15 ^c	2.75 ± 0.13 ^b	6.45 ± 0.09 ^a	0.38 ± 0.01 ^f
M-4	50.9 ± 0.22 ^c	Nd	5.52 ± 0.17 ^e	3.64 ± 0.12 ^b	6.68 ± 0.23 ^a	2.04 ± 0.07 ^j	0.27 ± 0.01 ^{g,h}
M-5	35.7 ± 0.62 ^f	Nd	2.54 ± 0.12 ^k	2.86 ± 0.10 ^d	0.62 ± 0.00 ^g	4.54 ± 0.08 ^b	1.54 ± 0.07 ^c
M-6	44.6 ± 0.80 ^d	2.61 ± 0.04 ^a	4.00 ± 0.05 ^g	1.61 ± 0.04 ^{i,j}	2.52 ± 0.06 ^c	1.79 ± 0.04 ^k	0.17 ± 0.00 ^{i,k}
M-7	58.3 ± 1.06 ^a	Nd	2.65 ± 0.10 ^k	2.32 ± 0.04 ^{f,g}	0.80 ± 0.03 ^g	1.69 ± 0.05 ^k	0.80 ± 0.02 ^d
M-8	33.1 ± 1.03 ^g	Nd	3.01 ± 0.06 ^j	1.85 ± 0.02 ^h	1.00 ± 0.04 ^f	3.27 ± 0.07 ^e	0.59 ± 0.02 ^e
M-9	14.3 ± 0.30 ^k	Nd	3.00 ± 0.08 ^j	1.85 ± 0.10 ^h	1.19 ± 0.02 ^{e,f}	1.98 ± 0.03 ^j	0.43 ± 0.01 ^f
M-10	39.2 ± 0.72 ^e	Nd	3.62 ± 0.13 ^h	4.15 ± 0.06 ^a	1.07 ± 0.02 ^{e,f}	2.57 ± 0.09 ^h	0.60 ± 0.02 ^e
M-11	19.1 ± 0.41 ⁱ	Nd	2.55 ± 0.05 ^k	2.20 ± 0.09 ^g	0.79 ± 0.02 ^g	2.95 ± 0.03 ^g	2.13 ± 0.07 ^a
M-12	52.6 ± 0.54 ^b	Nd	3.38 ± 0.05 ⁱ	2.82 ± 0.14 ^d	2.00 ± 0.03 ^d	2.88 ± 0.09 ^g	0.30 ± 0.01 ^g
MFR	39.4 ± 0.66 ^e	Nd	6.38 ± 0.18 ^d	2.31 ± 0.07 ^{f,g}	Nd	2.44 ± 0.06 ⁱ	0.25 ±
MIT	17.1 ± 0.10 ^j	Nd	8.59 ± 0.23 ^a	1.89 ± 0.01 ^h	Nd	0.67 ± 0.01 ^l	0.11 ± 0.00 ^{k,l}
MMA	30.5 ± 0.96 ^h	Nd	7.13 ± 0.25 ^b	2.59 ± 0.13 ^e	1.23 ± 0.04 ^e	3.51 ± 0.16 ^d	0.21 ±
MSL	52.7 ± 2.30 ^b	Nd	6.77 ± 0.12 ^c	2.64 ± 0.07 ^e	Nd	1.74 ± 0.07 ^k	0.19 ± 0.01 ^{i,j}
MSP	30.9 ± 0.45 ^h	Nd	6.18 ± 0.24 ^d	1.65 ± 0.02 ⁱ	1.86 ± 0.10 ^d	1.80 ± 0.01 ^k	0.06 ± 0.00 ^l

Oznake: M-1 to M-12 Merlot vina iz Srbije; MFR - Merlot vino iz Francuske; MIT - Merlot vino iz Italije; MMA - Merlot vino iz Makedonije; MSL - Merlot vino iz Slovenije; MSP - Merlot vino iz Španije; *vrednosti prikazane u tabeli su srednja vrednost tri merjenja ± standardna devijacija; [‡]Različita slova (a-k) u eksponentu u istoj koloni table ukazuju na statistički značajnu razliku između vrednosti, pri nivou značajnosti od ≤ 0.05 (na osnovu post-hoc Tukey-evog HSD testa); [§]analizirane, ali nisu detektovane: 4-hidroksibenzoeva i hlorogenska kiselina; [‡]Nd - nije detektovano.

Hlorogenska i 4-hidroksibenzoeva kiselina nisu detektovane ni u jednom uzorku, dok je prisustvo vanilinske kiseline potvrđeno samo u uzorku M6. Ovo vino se od drugih vojvodanskih vina razlikuje po tome što je njegov proizvođač velika vinarija, koja osim grožđa iz Vojvodine kao sirovinu koristi i grožđe iz Makedonije. Međutim, uočavaju se razlike između ovog vina i vina iz makedonske vinarije. Nasuprot rezultatima prikazanim u ovom radu, vanilinska kiselina je detektovana u *Merlot* vinima iz nekih drugih država, kao što su Turska (4.66–4.85 mg/L, Anli i Vural, 2009), Brazil (2.13–3.78 mg/L, Gris i sar., 2013), Francuska i Italija (2.40–4.71 i 2.4 mg/L, Van Leeuw i sar., 2014).

Dominantna fenolna kiselina u svim uzorcima je galna kiselina, čiji sadržaj varira od 14.3 (M9) do 58.3 mg/L, koliko je detektovno u uzorku M7. Ne uočavaju se razlike u sadržaju galne kiseline između vina u zavisnosti od porekla, ali može se uočiti da je najveća koncentracija galne kiseline prisutna u starijim vinima (M4, berba 2008; M7, berba 2013; M12, berba 2012 i MSL, berba 2012), iako neka starija vina (M5, 2011 i M10, 2012) imaju prosečan sadržaj ovog jedinjenja. Analizom promene hemijskog sastava tokom procesa vinifikacije, od grožđa do vina, Lingua i saradnici (2016) nisu detektovali galnu kiselinu u grožđu i komini, nego tek u vinu tokom fermentacije (45.8 mg/L), pri čemu se sadržaj galne kiseline povećao do kraja procesa vinifikacije (63.4 mg/L). Oni su pretpostavili da tokom fermentacije dolazi do hidrolize galatnih estara flavonoida usled čega se količina galne kiseline povećava (Lingua i sar., 2016). Stavridou i saradnici (2016) smatraju da se sadržaj galne kiseline raste tokom odležavanja vina, nezavisno u kom sudu se ono odvija. Međutim, ukoliko se vino čuva u

hrastovom buretu, može doći do ekstrakcije hidrolizujućih tanina iz drveta u vino, usled čega se dodatno povećava koncentracija galne kiseline. Nasuprot tome, Gris i saradnici (2013) su odredili veći sadržaj galne kiseline u mlađim vinima. Međutim, iako su uočili statistički značajne razlike između različitih berbi, oni navode da se tokom starenja vina u bocama, sadržaj hidroksibenzoevih kiselina ne menja značajno.

Galna kiselina je u velikom broju studija predstavljala jedno od dominantnih polifenolnih jedinjenja u vinu. Međutim, ukoliko se uporedi sadržaj galne kiseline (Tabela 6.17.) sa ranije objavljenim rezultatima, uočavaju se velike razlike u prisutnim koncentracijama. Na primer, Rastija i saradnici (2009) su u *Merlot* vinu iz Istre detektovali 11.1 mg/L, dok su Šeruga i saradnici (2013) u vinu iz istog regiona odredili znatno veći sadržaj galne kiseline (55.5 mg/L). Takođe, količina galne kiseline u ispitivanom makedonskom vinu (30.5 mg/L) razlikuje se od detektovanih u makedonskim *Merlot* vinima, analiziranim u dva rada Ivanova-Petropulos i saradnika: u prvom radu određene koncentracije galne kiseline su bile između 7.63 i 8.23 mg/L (Ivanova-Petropulos i sar., 2015a), dok je u drugom radu sadržaj varirao između 303 i 847 mg/L (Ivanova-Petropulos i sar., 2015b).

Sa druge strane, sadržaj galne kiseline u turskim (52.0–52.1 mg/L, Anli i Vural, 2009) i brazilskim *Merlot* vinima (41.6–54.4 mg/L, Gris i sar., 2013) je u skladu sa sadržajem prikazanim u ovom radu, dok je u francuskom i italijanskom *Merlot* vinu detektovan veći sadržaj (26.1–94.3 mg/L i 91.3 mg/L, Van Leeuw i sar., 2014). Takođe, veći sadržaj galne kiseline imala su i sicilijanska *Merlot* vina iz 2002. godine (58.1–107 mg/L, La Torre i sar., 2006).

Kafena kiselina je takođe zastupljena u svim uzorcima, pri čemu se uočavaju razlike u sadržaju ove kiseline u vojvođanskim vinima i vinima iz drugih evropskih zemalja. Naime, u vojvođanskim vinima je najniža koncentracija kafene kiseline detektovana u uzorcima M5 i M11 (2.54 i 2.55 mg/L), dok je najviše kafene kiseline prisutno u uzorcima M1 i M4 (5.54 i 5.52 mg/L). Od inostranih vina, najveći sadržaj je detektovan u italijanskom (8.59 mg/L), dok je najniži sadržaj određen u slovenačkom *Merlot* vinu (6.18 mg/L). Italijansko vino se izdvaja upravo po visokom sadržaju kafene kiseline, jer je koncentracija svih drugih polifenolnih jedinjenja približna kao u vojvođanskim, odnosno niža nego u drugim evropskim vinima.

Ukoliko se uporedi sadržaj kafene kiseline u vojvođanskim i evropskim vinima prisutnim na novosadskom tržištu, sa sadržajem kafene kiseline u *Merlot* vinima nekih drugih regiona, uočava se da vina iz drugih država sadrže približno (5.00 mg/L, Šeruga i sar., 2013; 8.55–9.16 mg/L, Gris i sar., 2013; 3.24–12.2 mg/L, Van Leeuw i sar., 2014; 8.10–12.9 mg/L, Ivanova-Petropulos i sar., 2015a) ili znatno više kafene kiseline (21.6 mg/L, Rastija i sar., 2009; 11.5–19.3, Ivanova-Petropulos i sar., 2015b). Osim kafene i *p*-kumarinske kiseline, u vinima su u visokim koncentracijama prisutni i tartaratni estri ovih kiselina (Gris i sar., 2013).

Sadržaj *p*-kumarinske kiseline je bio približan u uzorcima vojvođanskih i inostranih vina i u skladu sa prethodno objavljenim radovima (4.4 mg/L, Rastija i sar., 2009; 4.2 mg/L, Šeruga i sar., 2011; 5.31–7.73, Gris i sar., 2013; 1.41–4.97, Van Leeuw i sar., 2014). Jedino je u radu Ivanova-Petropulos i saradnika (2015b) detektovan veći sadržaj

ove fenolne kiseline (1.1–21.9 mg/L). S obzirom da *p*-kumarinska kiselina u vinu stupa u reakcije sa antocijanima, a gradi i estre sa vinskom kiselinom, očigledne razlike u sadržaju *p*-kumarinske kiseline mogu biti posledica ovih reakcija (Gris i sar., 2013; Lingua i sar., 2016).

Interesantno je da u analiziranim uzorcima najveći sadržaj siringinske kiseline određen u uzorku M4, proizvedenom od grožđa koje raste na peskovitom tlu. Naime, ukoliko bi se nakon analize većeg broja uzorka iz Vojvodine ovo utvrdilo kao pravilo, prisustvo siringinske kiseline bi potencijalno moglo da bude karakteristika ovih vina.

Analizom polifenolnog profila vina iz različitih regiona, uočava se da je sirniginska kiselina prisutna u velikom broju *Merlot* vina. Koncentracije siringinske kiseline određene u turskim (4.85–5.09 mg/L, Anli i Vural, 2009), francuskim i italijanskim *Merlot* vinima (4.60–10.8 mg/L, Van Leeuw i sar., 2014) su u skladu sa koncentracijom prisutnom u uzorku M4. Analogno sa sadržajem kafene, galne i kumarinske kiseline, u radu Ivanova-Petropulos i saradnika (2015b) određen je i znatno veći sadržaj siringinske kiseline (5.4–21.5 mg/L).

Sadržaj benzoeve kiseline varira od 0.67 mg/L, u italijanskom vinu, do 6.45 mg/L u vojvođanskom M3 vinu. Koncentracija *t*-cimentne kiseline je uglavnom bila ispod 1 mg/L, a nešto veće koncentracije su određene samo u uzorcima M1, M5 i M11.

U ispitivanim *Merlot* vinima određen je sadržaj i šest odabranih flavonoida i jednog stilbena, a rezultati su prikazani u *Tabeli 6.18*.

Tabela 6.18. Koncentracija detektovanih[§] flavonoida i stilbena u uzorcima Merlot vina*

Uzorak	Flavonoidi (mg/L) [£]						Stilbeni [£] (mg/L)
	Katehin	Naringenin	Kvercetin	Kemferol	Hesperetin	Rutin	Rezveratrol
M-1	16.8 ± 0.51 ^h	0.12 ± 0.00 ^{b,c}	Nd	Nd	Nd	Nd	4.67 ± 0.19 ^a
M-2	49.3 ± 1.23 ^a	0.21 ± 0.00 ^a	Nd	Nd	0.10 ± 0.00 ^f	Nd	0.91 ± 0.01 ^h
M-3	23.7 ± 1.14 ^f	Nd [¥]	Nd	Nd	Nd	Nd	0.43 ± 0.01 ^{ij}
M-4	9.10 ± 0.31 ^k	Nd	Nd	Nd	0.67 ± 0.03 ^b	Nd	0.34 ± 0.00 ^j
M-5	27.0 ± 0.97 ^e	0.11 ± 0.00 ^c	Nd	Nd	Nd	1.80 ± 0.08 ^a	2.49 ± 0.11 ^c
M-6	18.6 ± 0.43 ^g	Nd	0.83 ± 0.04 ^d	0.41 ± 0.01 ^d	0.78 ± 0.01 ^a	Nd	0.18 ± 0.00 ^k
M-7	30.2 ± 0.51 ^c	0.21 ± 0.00 ^a	0.65 ± 0.03 ^d	Nd	Nd	Nd	1.56 ± 0.03 ^f
M-8	28.7 ± 0.31 ^d	0.12 ± 0.00 ^{b,c}	1.78 ± 0.07 ^c	Nd	Nd	0.48 ± 0.01 ^d	2.45 ± 0.05 ^c
M-9	11.3 ± 0.62 ^j	0.11 ± 0.06 ^c	1.03 ± 0.03 ^d	Nd	Nd	Nd	1.15 ± 0.02 ^g
M-10	18.3 ± 0.27 ^g	0.11 ± 0.00 ^c	Nd	Nd	Nd	0.32 ± 0.01 ^e	1.91 ± 0.07 ^e
M-11	23.5 ± 0.96 ^f	0.14 ± 0.01 ^{b,c}	Nd	Nd	Nd	1.66 ± 0.03 ^b	3.32 ± 0.10 ^b
M-12	14.3 ± 0.73 ⁱ	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	0.51 ± 0.03 ⁱ
MFR	30.2 ± 0.88 ^c	0.20 ± 0.00 ^{a,b}	8.25 ± 0.09 ^a	1.00 ± 0.04 ^b	0.26 ± 0.01 ^c	Nd	2.17 ± 0.06 ^d
MIT	11.3 ± 0.07 ^j	Nd	2.25 ± 0.03 ^c	0.44 ± 0.00 ^d	0.28 ± 0.00 ^c	Nd	1.02 ± 0.02 ^{g,h}
MMA	29.2 ± 1.46 ^{c,d}	0.12 ± 0.00 ^{b,c}	7.84 ± 0.40 ^a	0.71 ± 0.03 ^c	0.21 ± 0.00 ^d	1.21 ± 0.04 ^c	1.78 ± 0.01 ^e
MSL	32.2 ± 0.90 ^b	0.15 ± 0.00 ^{b,c}	6.29 ± 0.03 ^b	0.67 ± 0.00 ^c	0.18 ± 0.00 ^e	0.48 ± 0.01 ^d	2.10 ± 0.04 ^d
MSP	15.2 ± 0.14 ⁱ	0.16 ± 0.00 ^b	7.98 ± 0.53 ^a	1.38 ± 0.03 ^a	0.20 ± 0.01 ^{d,e}	Nd	0.51 ± 0.02 ⁱ

Oznake: M-1 to M-12 Merlot vina iz Srbije; MFR - Merlot iz Francuske; MIT - Merlot vino iz Italije; MMA - Merlot iz Makedonije; MSL - Merlot iz Slovenije; MSP - Merlot vino iz Španije; ; *vrednosti prikazane u tabeli su srednja vrednost tri merenja ± standardna devijacija; [£]Različita slova (a-k) u eksponentu u istoj koloni tabele ukazuju na statistički značajnu razliku između vrednosti, pri nivou značajnosti od ≤ 0.05 (na osnovu post-hoc Tukey-evog HSD testa); [§]analizirane, ali nisu detektovane: 4-hidroksibenzoeva i hlorogenska kiselina; [¥]Nd - nije detektovano.

Najzastupljeniji flavonoid koji je bio prisutan u svim analiziranim uzorcima, u opsegu koncentracija od 9.10 (M4) do 49.3 mg/L (M2), je katehin, koji pripada klasi

flavan-3-ola. Favan-3-oli se ekstrahuju iz pokožice i semena grožđa i predstavljaju dominantnu klasu flavonoida u vinima. Katehin je jedna od glavnih monomernih jedinica tanina, a rezultati nekoliko istraživanja pokazuju da se tokom starenja vina sadržaj katehina smanjuje (Chira i sar., 2011; Gris i sar., 2011). Na osnovu rezultata prikazanih u *Tabeli 6.18.*, ne može da se donese ovako jasan zaključak, jer, iako najniži sadržaj katehina jeste detektovan u najstarijem analiziranom vinu, M4, pravilnost se ne uočava i kod drugih uzoraka.

Sadržaj katehina prikazan u *Tabeli 6.18.* je u skladu sa sadržajem katehina određenim u turskim (19.4–20.3 mg/L, Anli i Vural, 2009), brazilskim (25.0–34.7 mg/L, Gris i sar., 2011) i francuskim *Merlot* vinima iz berbi od 1979. do 2003. godine (10.0–31.2 mg/L, Chira i sar., 2011), kao i makedonskim *Merlot* vinima (35.9–51.4 mg/L, Ivanova-Petropulos i sar., 2015a).

Nasuprot tome, Van Leeuw i saradnici (2014) su odredili nešto viši sadržaj katehina u francuskim (26.2–72.2 mg/L) i italijanskom *Merlot* vinu (65.4 mg/L), prisutnim na tržištu Belgije. U makedonskim vinima, sadržaj katehina je varirao u opsegu od 0 (nije detektovan) do 649 mg/L (Ivanova-Petropulos i sar., 2015b), što je i do dvadeset puta veći sadržaj od onog određenog u MMA.

Zanimljivo je da je količina katehina detektovana u istarskom *Merlot* vinu iz 2002. godine bila mnogo niža (2.8 mg/L, Rastija i sar., 2009), dok je količina u vinu istog regiona iz 2005/2006. godine (46.2 mg/L, Šeruga i sar., 2013) približna količinama određenim u ovom radu, što dodatno svedoči da osim regiona, godina berbe i način vinifikacije imaju veliki uticaj na sadržaj polifenolnih jedinjenja.

U pogledu flavonola, uočava se da su kvercetin i kemferol prisutni u svim inostranim vinima, što nije slučaj sa vojvođanskim vinima. Kvercetin je najzastupljeniji (0.65 – 8.25 mg/L), dok je sadržaj kemferola znatno niži i iznosi od 0.41–1.38 mg/L, a ovakav model raspodele je u skladu sa ranije objavljenim istraživanjima (La Torre i sar., 2006; Rastija i sar., 2009; Gris i sar., 2013; Van Leeuw i sar., 2014).

Analizom polifenolnog profila vina iz različitih vinogradarskih regiona Hrvatske, kvercetin i kemferol nisu detektovani u vinima iz kontinentalnih, već samo u vinima iz priobalnih regiona, u kojima je zastupljena mediteranska klima, a koju karakteriše veći broj sunčanih dana. Poznato je da grožđe, koje je više izloženo sunčevim zracima, ima veći sadržaj polifenola i to prvenstveno flavonola (Rastija i sar., 2009). Uočena razlika između sadržaja flavonola između vina analiziranih u ovom radu potencijalno može da potiče od različitih klimatskih faktora podneblja u kojima je gajeno grožđe korišćeno za proizvodnju vojvođaskih vina (kontinentalna klima) i vina iz Francuske, Italije, Makedonije, Slovenije i Španije.

Sadržaj kvercetina i kemferola u inostranim *Merlot* vinama je u skladu sa onim detektovanim u vinima iz Istre (7.4 mg/L i 0.5 mg/L, redom, Rastija i sar., 2009; 4.8 mg/L - kvercetin, Šeruga i sar., 2013), ili francuskim i italijanskim vinima prisutnim na belgijskom tržištu (3.59–16.58 i 0.15–1.15 mg/L, redom, Van Leeuw i sar., 2014), a nešto niži od sadržaja u brazilskim (19.0–20.5 i 0.76–1.25 mg/L, redom, Gris i sar., 2013) i makedonskom *Merlot* vinu (3.36–28.2 i 0.26–1.16 mg/L, redom, Ivanova-Petropulos i sar., 2015a).

Rutin je detektovan u 6 od 17 analiziranih vina u opsegu koncentracija od 0.32 do 1.80 mg/L. Sadržaj rutina određen u *Merlot* vinima koja su komercijalno dostupna u Belgiji, a potiču iz Francuske ili Italije je nekoliko puta veći (2.37–7.03 mg/L, Van Leeuw i sar., 2014). Takođe, i koncentracija rutina prisutne u *Merlot* vinima poreklom sa Sicilije je nekoliko puta veća kako od sadržaja određenog u okviru ove disertacije, tako i od sadržaja detektovanog od strane Van Leeuw i saradnika (2014) i iznosi od 4.78 do 29.3 mg/L (La Torre i sar., 2014).

Flavanoni, naringenin i hesperitin su detektovani u niskim koncentracijama, od 0.11 do 0.21 mg/L odnosno od 0.10 do 0.78 mg/L, što je i bilo očekivano, jer, kako navode Ginjom i saradnici (2010), ova klasa flavonoida nije karakteristična za vino.

Sa druge strane, rezveratrol je jedno od jedinjenja koje je karakteristično za grožđe i vino. Naime, iako je u vinima prisutan u znatno nižim koncentracijama od drugih polifenolnih jedinjenja, biološka aktivnost crvenih vina se često povezuje upravo sa sadržajem ovog stilbena. Osnovni izvor rezveratrola u humanoj ishrani je grožđe i vino (Van Leeuw i sar., 2014).

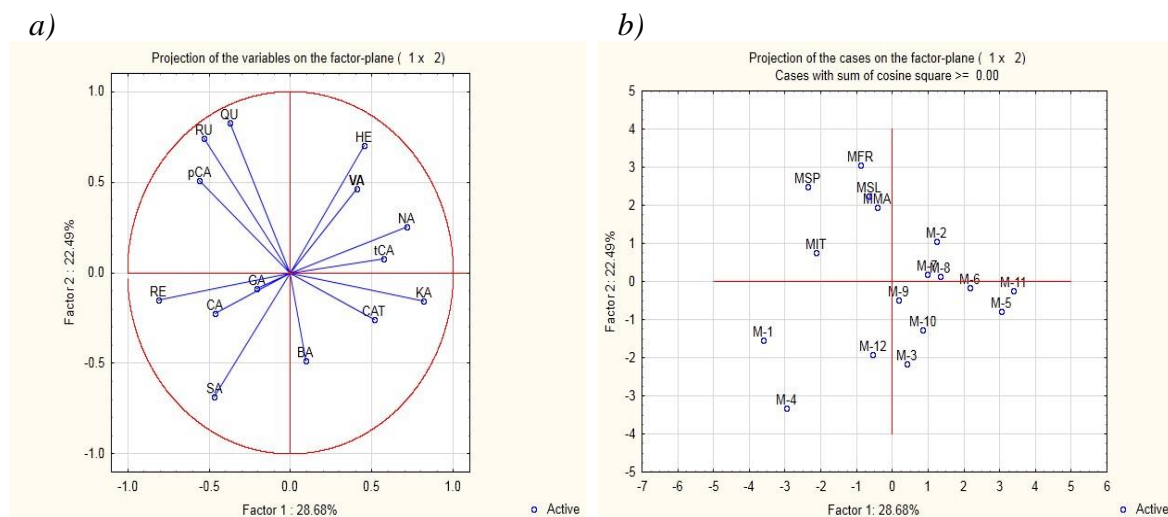
Najbogatije rezveratrolom je bilo vojvođansko vino M1 (4.67 mg/L), dok je u drugim uzorcima rezveratrol bio prisutan u opsegu koncentracija od 0.18 do 3.32 mg/L, pri čemu nisu izražene razlike između vojvođanskih i evropskih vina, kako u onim analiziranim u okviru ovog rada tako i onima koji su bili predmet prethodnih studija (1.2 mg/L, Rastija i sar., 2009; 0.89– 6.97 mg/L, Van Leeuw i sar., 2014).

U makedonskim vinima je prethodno analiziran sadržaj *trans*-rezveratrola, *cis*-rezveratrola, *trans*-piceida i *cis*-piceida. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da makedonska *Merlot* vina (berbe 2006–2008) sadrže mnogo više rezveratrola (14.5–21.3 mg/L *trans*-rezveratrola, 6.20–15.0 mg/L *cis*-rezveratrola) u odnosu na vina analizirana u okviru ove disertacije, ali da nije rezveratrol već piceid dominantan stilben u *Merlot* vinima (29.4–40.2 mg/L *trans*-piceida i 31.9–41.1 *cis*-piceida, Ivanova-Petropulos i sar., 2015a). La Torre i saradnici (2006) su tokom analize polifenolnog profila sicilijanskih *Merlot* vina detektovali mnogo niže koncentracije pomenutih stilbena, ali je model zastupljenosti bio isti, odnosno određene su veće koncentracije *trans*-piceida (1.48–3.70 mg/L) u odnosu na *trans*-rezveratrol (0.61–2.44 mg/L).

Primenom HPLC-UV/VIS tehnike određen sadržaj odabranih polifenolnih jedinjenja (9 fenolnih kiselina, 6 flavonoida, 1 stilbena). Dominantna polifenolna jedinjenja u svim uzorcima su galna kiselina (14.3 - 58.3 mg/L) i katehin (9.10 - 49.3 mg/L). Ne uočavaju se razlike u sadržaju ovih polifenola između vina u zavisnosti od porekla. Sa druge strane, sadržaj kafene kiseline detektovan u vojvođanskim vinima je niži od sadržaja u vinima iz drugih evropskih zemalja. Takođe, uočavaju se razlike i u pogledu flavonola, od kojih su kvercetin i kemferol prisutni u svim inostranim vinima, ali ne i u svim vojvođanskim vinima. Najbogatije rezveratrolom je bilo vojvođansko vino M1 (4.67 mg/L), dok je u drugim uzorcima rezveratrol bio prisutan u opsegu koncentracija od 0.18 do 3.32 mg/L, pri čemu nisu izražene razlike između vojvođanskih i evropskih vina.

Polifenolna jedinjenja doprinose senzornim i biološkim karakteristikama, a analizom hemijskog sastava može da utvrdi i poreklo i autentičnost vina. U cilju tačnije interpretacije prethodno prikazanih rezultata, odnosno valorizacije vojvođanskih vina u

odnosu na vina iz poznatih vinogradarskih regiona Evrope, primenjena je analiza glavnih komponenti (PCA) na normalizovane vrednosti detektovanih polifenolnih jedinjenja. Rezultati su prikazani na *Slici 6.5.*, a statistički podaci u *Tabeli 9.104.* se nalaze u *Prilogu.*



Slika 6.5. Analiza glavnih komponenti detektovanih fenolnih kiselina, flavonoida i stilbena u Merlot vinima

a) doprinos varijabli (normalizovanih vrednosti polifenolnih jedinjenja) na grafiku opterećenja (loadings plot);

b) raspodela analiziranih uzoraka Merlot vina u zavisnosti od ispoljene aktivnosti (scores plot)

Skraćenice: (a) BA - benzoeva kiselina; CA - kafena kiselina; CAT - katehin; GA - galna kiselina; HE - hesperitin; KA - kemferol; pCA - p-kumarinska kiselina; NA - naringenin; QU - kvercetin; RE - rezveratrol; RU - rutin; SA - siringinska kiselina; tCA - *trans*-cimentna kiselina; VA – vanilinska kiselina; (b) M-1 to M-12 Merlot vina iz Srbije; MFR - Merlot vino iz Francuske; MIT - Merlot vino iz Italije; MMA – Merlot vino iz Makedonije; MSL - Merlot vino iz Slovenije; MSP - Merlot vino iz Španije.

Faktor 1 (28.68) i Faktor 2 (22.49) najviše doprinose ukupnoj varijansi. Na osnovu sadržaja fenolnih kiselina, flavonoida i stilbena, uočava se grupisanje Merlot vina iz Francuske, Italije, Makedonije, Slovenije i Španije u gornje levom uglu prikazanog grafika. Iako nisu prisutna u visokim koncentracijama, jedinjenja koja najviše doprinose ovakvom diferenciranju od vojvođanskih vina su kvercetin, rutin i *p*-kumarinska kiselina. Na osnovu ovih rezultata, postoje indicije da bi se na osnovu rezultata analize polifenolnog profila, vojvođanska vina mogla razlikovati od vina iz nekih drugih regiona koja imaju različite edafske i klimatske faktore. Međutim, kako bi se proverila ova hipoteza neophodna je analiza znatno većeg broja uzoraka, uključujući i uzorke iz Mađarske, Hrvatske i Rumunije u kojima su zastupljeni slični klimatski faktori (Panonska nizija).

Posmatrajući prikazani grafik, uočava se razdvajanje i unutar vojvođanskih vina. Naime, izdvajanje uzoraka M1 i M4 uslovljava prvenstveno sadržaj rezveratrola i siringinske kiseline. Prikazani rezultati potvrđuju da na polifenolni sastav vina, osim regiona, veliki uticaj imaju i drugi faktori, kao što su sastav zemljišta, proces vinifikacije ili godina berbe.

Jedinjenja koja su se izdvojila kao dominantna u analiziranim *Merlot* vinima, galna kiselina, i katehin, ali rezveratrol, kao jedinjenje karakteristično za grožđe i vino su bili predmet mnogobrojnih *in vitro* i *in vivo* studija. Interesantno je napomenuti da rezultati *in vivo* ispitivanja na životinjama svedoče da galna kiselina ispoljava blagotvorne efekte na organizam ukoliko se konzumira pri koncentraciji od 0.2 mg/kg (Ferk i sar., 2007). Imajući u vidu ove podatke i sadržaj galne kiseline detektovane u analiziranim uzorcima, može da se pretpostavi da bi konzumiranje 270 mL (približno 2.5 čaše) vina M7 ispoljilo blagotvorno delovanje na organizam odrasle osobe (mase 80 kg). Rezultati studija na životinjama svedoče da rezveratrol, katehin i kvercetin sprečavaju razvoj ateroskleroze ukoliko se primenjuju u koncentracijama ekvivalentnim onim koje bi odrasla osoba (70 kg) unela konzumacijom dve čaše vina uz obrok (Auger i sar., 2005).

6.4.3. Određivanje sadržaja odabranih antocijana u *Merlot* vinima

Boja vina je prva karakteristika vina koja se uočava tokom degustacije i odabira vina. Antocijani su klasa polifenolnih jedinjenja odgovorna za boju vina, a ove komponente se u vino ekstrahuju iz pokožice grožđa tokom fermentacije. Smatra se da mlada vina imaju najintenzivniju boju, a tokom starenja, usled polimerizacije antocijana, boja vina dobija zagasitiju nijansu. Antocijani, kao i sva polifenolna jedinjenja doprinose biološkom potencijalu vina.

U okviru ove disertacije, u saradnji sa dr Ljiljom Torović, redovnim profesorom Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, urađena je kvantitativna analiza odabranih antocijana primenom tačne hromatografije visokih performansi sa UV/VIS detektorom (*Poglavlje 5.3.5.2.*). U ispitivanim vinima analiziran je sadržaj pet odabranih antocijana (glikozilovanih antocijana – antocijanina) za koja postoje literaturni navodi da su prisutni u *Merlot* vinima. Rezultati su prikazani u *Tabeli 6.19*.

Tabela 6.19. Koncentracija* odabranih antocijana u uzorcima Merlot vina

Uzorak	Antocijani (mg/L) [‡]				
	Delfinidin-3- <i>O</i> -glukozid	Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid	Petunidin-3- <i>O</i> -glukozid	Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid	Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid
M-1	1.16 ± 0.10 ⁱ	0.25 ± 0.01 ^h	1.75 ± 0.04 ^f	0.87 ± 0.06 ^g	19.1 ± 0.36 ^g
M-2	0.38 ± 0.01 ^k	0.16 ± 0.00 ^k	0.63 ± 0.02 ^h	0.28 ± 0.00 ^j	9.96 ± 0.54 ⁱ
M-3	3.79 ± 0.04 ^c	0.48 ± 0.01 ^c	5.66 ± 0.07 ^b	3.13 ± 0.11 ^c	66.5 ± 2.13 ^a
M-4	Nd	nd	0.17 ± 0.01 ⁱ	0.16 ± 0.01 ^j	2.63 ± 0.07 ^k
M-5	2.82 ± 0.01 ^d	0.35 ± 0.01 ^e	4.13 ± 0.30 ^c	2.24 ± 0.10 ^e	46.0 ± 3.03 ^c
M-6	0.74 ± 0.01 ^j	0.25 ± 0.01 ^h	1.12 ± 0.03 ^g	0.81 ± 0.02 ^g	15.4 ± 0.40 ^h
M-7	0.68 ± 0.01 ^j	0.21 ± 0.02 ⁱ	0.46 ± 0.02 ^{h,i}	0.54 ± 0.01 ^{h,i}	5.39 ± 0.25 ^j
M-8	2.15 ± 0.08 ^e	0.29 ± 0.02 ^g	3.30 ± 0.16 ^d	2.66 ± 0.11 ^d	39.4 ± 0.47 ^e
M-9	1.43 ± 0.04 ^{g,h}	0.32 ± 0.01 ^f	1.72 ± 0.02 ^f	1.28 ± 0.03 ^f	15.7 ± 0.57 ^h
M-10	1.84 ± 0.01 ^f	0.41 ± 0.01 ^d	2.00 ± 0.01 ^{e,f}	2.12 ± 0.15 ^e	17.5 ± 0.72 ^{g,h}
M-11	5.72 ± 0.05 ^a	1.11 ± 0.02 ^a	6.55 ± 0.43 ^a	5.86 ± 0.32 ^a	56.5 ± 0.72 ^b
M-12	0.36 ± 0.00 ^k	0.20 ± 0.01 ^j	0.26 ± 0.00 ⁱ	0.32 ± 0.00 ^j	3.62 ± 0.15 ^{j,k}
MFR	5.24 ± 0.01 ^b	0.56 ± 0.01 ^b	5.50 ± 0.14 ^b	3.58 ± 0.04 ^b	41.9 ± 1.05 ^d
MIT	1.56 ± 0.02 ^g	0.32 ± 0.02 ^f	1.67 ± 0.03 ^f	0.79 ± 0.03 ^g	11.0 ± 0.20 ⁱ
MMA	1.41 ± 0.10 ^h	0.32 ± 0.00 ^f	2.13 ± 0.09 ^e	0.74 ± 0.02 ^{g,h}	25.2 ± 1.82 ^f
MSL	0.41 ± 0.00 ^k	0.15 ± 0.00 ^k	0.28 ± 0.01 ^{h,i}	0.19 ± 0.01 ^j	4.49 ± 0.20 ^k
MSP	1.38 ± 0.02 ^h	0.18 ± 0.01 ^j	1.14 ± 0.06 ^g	1.14 ± 0.02 ^f	12.4 ± 0.04 ⁱ

Oznake: M-1 to M-12 Merlot vina iz Srbije; MFR - Merlot vino iz Francuske; MIT - Merlot vino iz Italije; MMA - Merlot vino iz Makedonije; MSL - Merlot vino iz Slovenije; MSP - Merlot vino iz Španije; *vrednosti prikazane u tabeli su srednja vrednost tri merenja ± standardna devijacija; [‡]Različita slova (a-k) u eksponentu u istoj koloni tabele ukazuju na statistički značajnu razliku između vrednosti, pri nivou značajnosti od ≤ 0.05 (na osnovu post-hoc Tukey-evog HSD testa).

Malvidin-3-*O*-glukozid je dominantan antocijanin u svim uzorcima, a prisutan je u opsegu koncentracija od 2.63 do 66.5 mg/L. Od analiziranih antocijanina u vinima je detektovan najniži sadržaj cijanidin-3-*O*-glukozida (0.15–1.11 mg/L). Malvidin-3-*O*-glukozid i cijanidin-3-*O*-glukozid su se i prethodnim studijama izdvojili kao najzastupljeniji, odnosno najmanje zastupljen antocijanin u Merlot vinima (Dimitrovska i sar., 2013; Gris i sar., 2013, Mitić i sar., 2014).

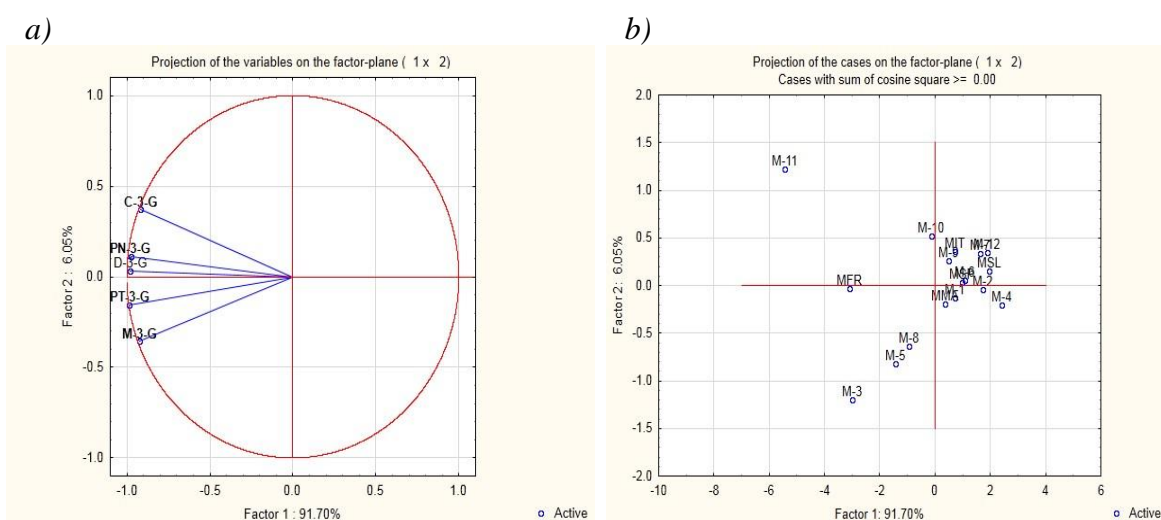
Ukoliko se uporede analizirana vina, najveći sadržaj antocijanina određen je u uzorcima vojvođanskih vina M3 i M11. Od inostranih vina, francusko vino se izdvojilo kao najbogatije antocijaninima, pri čemu je u čak tri vojvođanska vina detektovana viša količina ovih jedinjenja. Najniži sadržaj antocijanina nalazi se u uzorku M4. Kao što je ranije navedeno, ovo vino je najstarije od svih analiziranih vina, pa može da se pretpostavi da je tokom godina došlo do njihove polimerizacije (Gris i sar., 2013).

Ukoliko se rezultati uporede sa ranije objavljenim rezultatima Mitića i saradnika (2014), uočava se sličnost u sadržaju antocijanina (delfinidin-3-*O*-glukozid 1.22 mg/L, cijanidin-3-*O*-glukozid 0.13 mg/L, petunidin-3-*O*-glukozid 1.52 mg/L, peonidin-3-*O*-glukozid 0.54 mg/L, malvidin-3-*O*-glukozid 15.47 mg/L). Pregledom dostupnih podataka, zapaža se da je sličan sadržaj antocijana određenim u brazilskim (Gris i sar., 2013) i makedonskim vinima (Dimitrovska i sar., 2013; Ivanova-Petropulos i sar., 2015a), pri čemu su prisutne velike varijabilnosti u zavisnosti od starosti vina. Velika odstupanja se uočavaju jedino u odnosu na sadržaj antocijanina u makedonskim vinima analiziranim u radu Ivanova-Petropulos i saradnika (2015b), u kojima je određen i deset

puta veći sadržaj antocijana, kao na primer sadržaj malvidin-3-*O*-glukozida u koji je bio u opsegu od 173-408 mg/L.

U nekoliko studija su bili analizirani i monoglukozidni antocijanini acetilovani *p*-kumarnom i sirćetnom kiselinom, od kojih je najzastupljeniji bio malvidin-3-glukozid acetat (7.47 mg/L, Mitić i sar., 2014; 2.38–6.27 mg/L, Gris i sar., 2013). Osim što doprinose boji i strukturnim karakteristikama, antocijani mogu da se koriste i kao hemotaksonomski markeri različitih sorti grožđa, pri čemu se prilikom ovih analiza koriste odnosi sadržaja derivata monoglukozidnih antocijanina i sirćetne i kumarinske kiseline, kao i međusobni odnosi sadržaja pojedinačnih antocijanina (Dimitrovska i sar., 2013).

Kako bi se dobio bolji uvid u međusobne razlike i potencijalno klasifikovali uzorci na osnovu sastava antocijana, primenjena je analiza glavnih komponenti na normalizovane vrednosti detektovanih koncentracija odabranih antocijana (Slika 6.6.). Tabele sa odgovarajućim statističkim podacima nalaze se u *Prilogu*.



Slika 6.6. Analiza glavnih komponenti detektovanih antocijana u Merlot vinima

a) doprinos varijabli (normalizovanih vrednosti antocijana) na grafiku opterećenja (loadings plot);

b) raspodela analiziranih uzoraka Merlot vina u zavisnosti od ispoljene aktivnosti (scores plot)

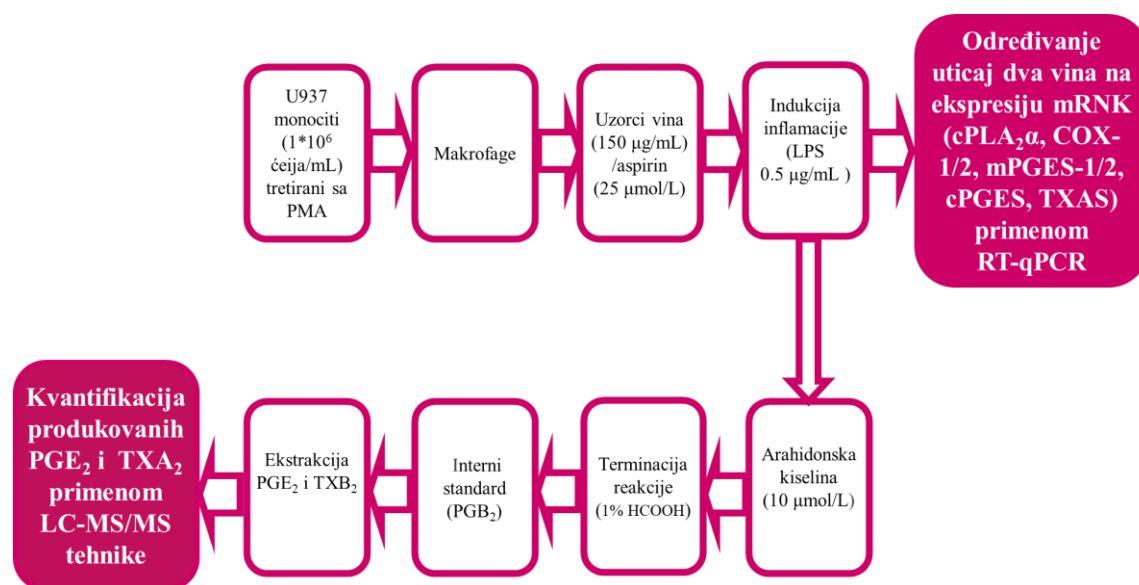
Oznake: (a) C-3-G - cijanidin 3-*O*-glukozid; D-3-G - delphinidin 3-*O*-glukozid; M-3-G - malvidin 3-*O*-glukozid; PN-3-G - peonidin 3-*O*-glukozid; PT-3-G - petunidin 3-*O*-glukozid; (b) Oznake: M-1 do M-12 Merlot vina iz Srbije; MFR - Merlot vino iz Francuske; MIT - Merlot vino iz Italije; MMA - Merlot vino iz Makedonije; MSL - Merlot vino iz Slovenije; MSP - Merlot vino iz Španije.

Uočava se diferenciranje nekoliko uzoraka analiziranih Merlot vina koja su se i na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 6.19. jasno izdvojila kao najbogatija ispitivanim antocijaninima. Uzorci M3 i MFRA, ali i M5 i M8 se prvenstveno odvajaju po visokom sadržaju malvidin-3-*O*-glukozida. Uzorak M11 se jedni nalazi u gornjem levom uglu prikazanog grafika. Naime, iako je bogat svim ispitanim antocijanima, ovaj uzorak sadrži dvostruko više cijanidin-3-*O*-glukozida od drugih analiziranih vina, i upravo zahvaljujući sadržaju ovog jedinjenja pozicioniran je odvojeno od drugih vina.

6.4.4. Uticaj *Merlot* vina na produkciju PGE₂ i TXA₂ u makrofagama

Vino je poznato po svom kardioprotektivnom delovanju, koje se prvenstveno pripisuje polifenolnim jedinjenjima prisutnim u vinu. Kardioprotektivnom delovanju vina doprinosi hipolipidemijski, antioksidantni i anti-inflamatorni potencijal polifenolnih jedinjenja. Uloga koju imaju TXA₂, kao glavni faktor agregacije trombocita, u patogenezi kardiovaskularnih oboljenja dobro je poznata. Ekspresija COX-1, COX-2 i TXAS mRNK je povećana u aterosklerotičnim plakovima, pri čemu je uočena veća korelacija između aktivnosti COX-1 i TXAS (Gabrielsen i sar., 2010). Takođe, i PGE₂ značajno doprinosi razvoju bolesti kardiovaskularnog sistema. Naime, uočena je povećana ekspresija COX-2 u aterosklerotičnim plakovima, a PGE₂ produkovan od strane aktiviranih makrofaga podstiče hemotaksiju, produkciju citokina, migraciju i proliferaciju glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova, što doprinosi razvoju ateroskleroze (Beloqui i sar., 2005). Pored toga što makrofage imaju ključnu ulogu u razvoju aterosklerotskog plaka, prepoznate su kao odličan *in vitro* model sistem inflamacije. Imajući u vidu navedene činjenice, uticaj vina na produkciju PGE₂ i TXA₂ ispitan je upravo u makrofagama u kojima je inflamacija izazvana dodatkom LPS.

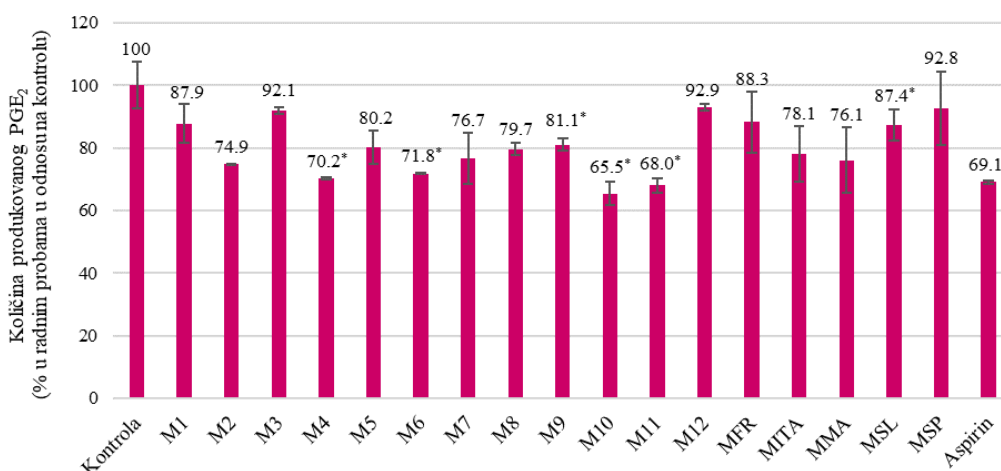
U okviru ove disertacije analiziran je uticaj 17 uzoraka *Merlot* vina na produkciju PGE₂ i TXA₂, kao i dva vina na ekspresiju mRNK enzima uključenih u sintezu ovih lipidnih signalnih molekula, kako bi se utvrdilo da li i modulacija metabolizma arahidonske kiseline predstavlja jedan od mehanizama kardioprotektivnog delovanja vina. Model sistem su predstavljale U937 makrofage u kojima je dodatkom LPS indukovana inflamacija. Šema eksperimentalne procedure prikazana je na Slici 6.7.



Slika 6.7. Šema eksperimentalne procedure korišćene za analiziranje uticaja *Merlot* vina na produkciju PGE₂ i TXA₂ u LPS-stimulisanim makrofagama

U primenjenom model sistemu, produkcija PGE₂ inicijalno zavisi od aktivnosti obe izoforme cikooksigenaze, pri čemu se smatra da veći doprinos ima COX-2, čija ekspresija je znatno povećana dejstvom inflamatornog stimulusa, LPS-a. Rezultati

ispitivanja uticaja uzoraka *Merlot* vina na produkciju PGE₂ prikazani su na *Histogramu* 6.22.



Histogram 6.22. Uticaj* *Merlot* vina[‡] i aspirina[£] na produkciju PGE₂[§] u LPS-stimulisanim makrofagama

Oznake: M-1 to M-12 *Merlot* vina iz Srbije; MFR - *Merlot* iz Francuske; MIT - *Merlot* vino iz Italije; MMA - *Merlot* iz Makedonije; MSL - *Merlot* iz Slovenije; MSP - *Merlot* vino iz Španije; * statistički značajno različito od kontrole ($p \leq 0.05$); [‡] koncentracija 150 $\mu\text{g/mL}$; [£] koncentracija aspirina 25 $\mu\text{mol/L}$; [§] Količina proizvedenog PGE₂ (%) predstavlja odnos površine pikova PGE₂ i internog standarda PGB₂ u radnim probama i površine pikova PGE₂ i PGB₂ u kontroli

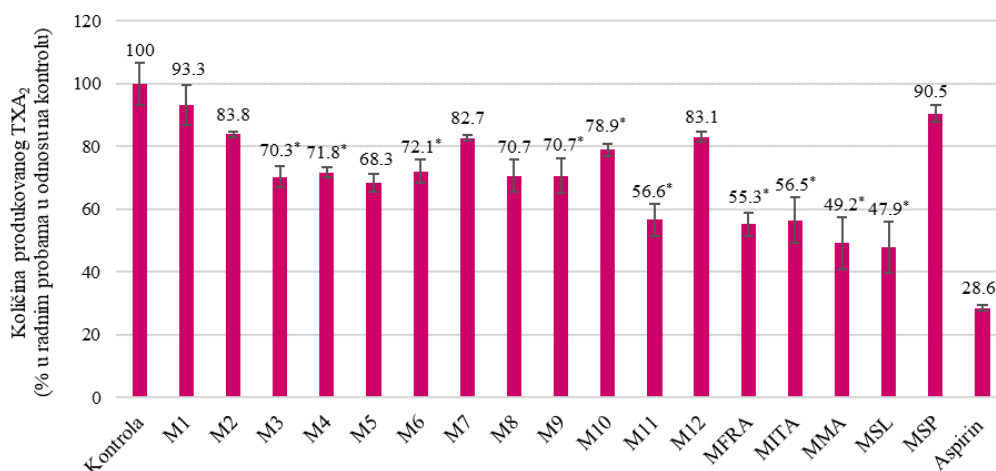
Posmatrajući priloženi *Histogram* 6.22. zapaža se da je šest uzoraka *Merlot* vina redukovalo produkciju PGE₂ u odnosu na kontrolu, makrofage u kojima je izazvana inflamacija dodatkom LPS. Sposobnost inhibicije produkcije PGE₂ je bila u opsegu od 12.6 (MSLO) do 34.5% (M10), pri čemu su vojvođanska vina (M4, M6, M10 i M11) ispoljila bolji potencijal. Iako su neka vina ostvarila i dvostruko veću inhibiciju u odnosu na MSLO, njihov uticaj nije statistički značajan.

Prema dostupnim podacima, pretpostavlja se da je ovo prvi put da je ispitan uticaj *Merlot* vina na produkciju PGE₂ u *in vitro* modelu inflamacije. Postoji samo nekoliko istraživanja u kojima je ispitan uticaj crvenih vina na produkciju ovog proinflatornog medijatora. Rezultati *ex vivo* ispitivanja dijetetskog suplementa „*Provinols*TM“, dobijenog ekstrakcijom polifenola iz crvenog vina, pokazala su da ovaj preparat u aortama smanjuje produkciju TXA₂ i 8-izoprostana, a ne utiče na produkciju PGE₂ i PGI₂, dok je u malim mesenteričnim aortama smanjio produkciju 8-izoprostana i PGE₂, a nije uticao na produkciju TXA₂ i PGI₂ (Agouni i sar. 2017).

Sposobnost vina da inhibiraju agregaciju trombocita bila je predmet velikog broja studija. S obzirom da je TXA₂ snažan faktor agregacije trombocita, smatra se da jedinjenja koja inhibiraju agregaciju posredno modulišu i produkciju TXA₂.

Nakon trombocita, najveća količina TXA₂ se proizvodi u monocitima i makrofagama, što ove ćelije čini dobrim model sistemom za ispitivanje uticaja na sintezu TXA₂ (Smyth, 2010). Takođe, u *ex vivo* studijama je primećeno je da u aterosklerotičnim plakovima dodatkom LPS ili arahidonske kiseline povećana produkcija TXA₂ (Gabrielsen i sar., 2010). Rezultati ispitivanja 12 vojvođanskih i po jednog vina iz

Francuske, Italije, Makedonije, Slovenije i Španije kao modulatora produkcije TXA₂ prikazani su na *Histogramu 6.23*.



Histogram 6.23. Uticaj Merlot vina[‡] i aspirina[£] na produkciju TXA₂[§] u LPS-stimulisanim makrofagama*

Oznake: M-1 to M-12 Merlot vina iz Srbije; MFR - Merlot iz Francuske; MIT - Merlot vino iz Italije; MMA - Merlot iz Makedonije; MSL - Merlot iz Slovenije; MSP - Merlot vino iz Španije; * statistički značajno različito od kontrole ($p \leq 0.05$); [‡] koncentracija 150 $\mu\text{g/mL}$; [£] koncentracija aspirina 25 $\mu\text{mol/L}$; [§] Količina produkovanog TXA₂ (%) predstavlja odnos površine pikova TXA₂ i internog standarda PGB₂ u radnim probama i površine pikova TXA₂ i PGB₂ u kontroli

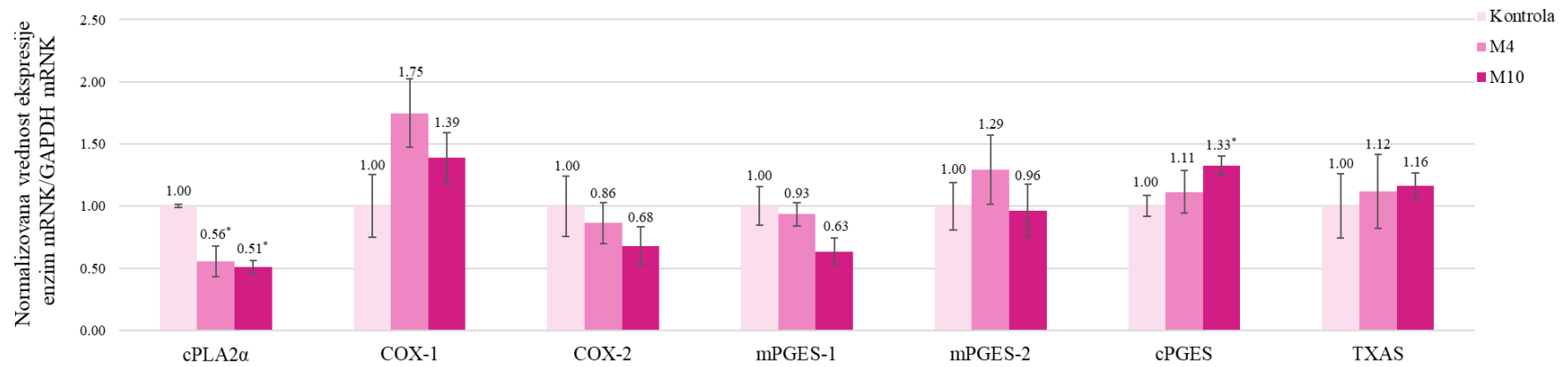
Od analiziranih 17 vina 10 vina je smanjilo produkciju TXA₂ u odnosu na kontrolu. Inhibitorski potencijal ostalih uzoraka nalazi se u opsegu od 21.1 (M10) do 52.1% (MSL). Uz izuzetak španskog Merlot vina, inostrana vina su ispoljila značajniji uticaj na produkciju TXA₂. Zanimljivo je da uzorak vina M11 ima aktivnost sličniju inostranim vinima, dok se vino M1, iz istog regiona i godine berbe, može smatrati neaktivnim.

Rezultati studije o uticaju vina na izolovane COX-1 i COX-2 enzime pokazuju da crvena vina iz različitih evropskih zemalja imaju veći afinitet inhibicije COX-1 (Kutil i sar., 2014). U radu Gabrielsen i saradnici (2010) je utvrđeno da je aktivnost TXAS povezana prvenstveno sa COX-1. Navedeni rezultati su u skladu sa rezultatima ove teze, jer su vina iz Francuske, Italije, Makedonije i Slovenije bolje supresovala produkciju TXA₂, za koji se smatra da dominantno potiče od COX-1, nego produkciju PGE₂ koji u primenjenom model sistemu prvenstveno potiče od COX-2.

Posmatranjem vrednosti prikazanih na *Histogramu 6.22.* i *6.23.* uočava se da vođovdanska Merlot vina pri koncentraciji od 150 $\mu\text{g/mL}$ ispoljavaju sličan potencijal inhibicije produkcije i PGE₂ i TXA₂. Aspirin, jedan od najpoznatijih inhibitora ciklooksigenaze, korišćen je kao referentno jedinjenje. Nekoliko vina ima približno istu sposobnost inhibicije produkcije PGE₂ kao i aspirin (25 $\mu\text{mol/L}$). Međutim, aspirin poseduje bar dvostruko veći potencijal inhibicije TXA₂ u odnosu na sva analizirana vina. Jasnija interpretacija prikazanih rezultata se može dobiti ukoliko se uslovi primenjeni u eksperimentu (1×10^6 monocita/mL, koncentracija vina 150 $\mu\text{g/mL}$, koncentracija aspirina 25 $\mu\text{mol/L}$) prevedu u *in vivo* uslove u humanom organizmu ($0.2 - 1 \times 10^9$ monocita/L, približno 5 L krvi). Na osnovu prikazanih rezultata i ove aproksimacije, može se doći do zanimljivih zaključaka. Posmatrajući uzorak M11, kao jedan od

najaktivnijih uzoraka vina, može se primetiti da 9.52 μL ovog uzorka (masa suvog ostatka 31.51 mg/mL, *Poglavlje 5.2.2.*) pokazuje sličan potencijal inhibicije produkcije PGE_2 i dvostruko slabiji potencijal inhibicije produkcije TXA_2 u odnosu na 9 μg aspirina. Odnosno, 79 mL vina (manje od jedne čaše) ispoljava dvostruko slabiju sposobnost inhibicije TXA_2 i približan potencijal inhibicije PGE_2 kao 75 mg aspirina, što predstavlja najnižu dozu aspirina koja se preporučuje za prevenciju kardiovaskularnih bolesti. Navedeni rezultati sugerišu da je jedan od mehanizama kardioprotektivnog delovanja vina sličan mehanizmu delovanja aspirina, i da on zapravo predstavlja sposobnost modulacije ciklooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline. Sa druge strane, ove količine vina koje imaju potencijalnu kardioprotektivnu ulogu su u skladu sa opisanim fenomenom „Francuskog paradoksa“, koji podrazumeva zdravstvene benefite umerene konzumacije crvenog vina (Renaud i Lorget, 1992).

Kao što je ranije navedeno, snižen nivo PGE_2 i TXA_2 može biti posledica inhibicije ekspresije mRNK, proteina ili aktivnosti enzima uključenih u produkciju ovih lipidnih medijatora. U cilju detaljnijeg proučavanja mehanizma delovanja, dva vojvođanska vina koja su ispoljila statistički značajnu inhibiciju produkcije i PGE_2 i TXA_2 izabrana su za dalje eksperimente u kojima je ispitivan uticaj *Merlot* vina na ekspresiju mRNK *cPLA $_2\alpha$* , *COX-1*, *COX-2*, *mPGES-1*, *mPGES-2*, *cPGES* i *TXAS* (*Histogram 6.24.*). Analiziran je efekat na ekspresiju mRNK svih enzima, jer postoji mogućnost da uzorci vina utiču na ekspresiju mRNK enzima čiju ekspresiju LPS ne modifikuje, što posledično može da utiče i na količinu PGE_2 i TXA_2 .



Histogram 6.24. Uticaj* odabranih Merlot vina[‡] na ekspresiju cPLA $_{2\alpha}$, COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2, cPGES i TXAS mRNK u LPS-stimulisanim makrofagama

* statistički značajno različito od kontrole ($p \leq 0.05$); [‡] koncentracija 150 $\mu\text{g/mL}$

U primjenjenom model sistemu, inflamacija je izazvana dodatkom LPS, a ovaj tretman snažno povećava ekspresiju cPLA₂α, COX-2 i mPGES-1 mRNK u makrofagama. Analizirana vina su statistički značajno supresovala ekspresiju samo cPLA₂α mRNK. Iako se u navedenom model sistemu, u kom je kao supstrat korišćena egzogena arahidonska kiselina, uticaj na cPLA₂α mRNK ne može direktno povezati da rezultatima prikazanim na *Histogramima* 6.22. i 6.23., ovo može da bude jedan od mehanizama kojima vina moduliraju produkciju PGE₂ i TXA₂. Naime, inhibicija ekspresije cPLA₂α mRNK predstavlja zapravo inhibiciju inicijalne faze metabolizma arahidonske kiseline - njeno oslobađanje iz membrane dejstvom cPLA₂α, a samim tim i smanjenu količinu supstrata za COX-1/2.

Takođe, na osnovu prikazanih rezultata, postoje indicije da bi vina navedenim mehanizmom mogla da smanje i produkciju lipidnih medijatora koji nastaju u LOX-putu metabolizma arahidonske kiseline, uključujući i leukotriene koji imaju značajnu funkciju u oboljenjima kao što su alergije, artritis, psorijaza i astma. Potencijal vina da inhibiraju produkciju LTB₄ proučavan je korišćenjem 5-LOX izolovanog enzima (Kutil i sar., 2014).

Uzorak M10 je ispoljio veći potencijal inhibicije produkcije PGE₂ u odnosu na M4, što je u korelaciji sa većim potencijalom inhibicije ekspresije mRNK enzima uključenih u produkciju PGE₂ u inflamaciji, COX-2 i mPGES-1, iako uticaj vina na ove enzime nije statistički signifikantan. Takođe, s obzirom da je u aterosklerotičnim plakovima povišena ekspresija i COX-1, koja je u korelaciji sa povišenom ekspresijom TXAS (Gabrielsen i sar., 2010), potrebna su detaljnija ispitivanja vina kao modulatora ekspresije ovih enzima. Ni jedno vino nije delovalo na ekspresiju TXAS mRNK, koja je takođe povećana delovanjem LPS, što implicira da je smanjena produkcija TXA₂ posledica direktne inhibicije aktivnosti TXAS ili uticaja na druge enzime uključene u produkciju TXA₂.

Nunes i saradnici (2013) su pokazali da ekstrakt portugalskog crvenog vina u opsegu koncentracija od 100 do 600 µg/mL inhibira ekspresiju COX-2, kao i NF-κB signalnu kaskadu. Takođe, rezultati njihovog ispitivanja pokazala su da ekstrakt vina može da bude modulator i nekih drugih signalnih puteva, npr. da inhibira JAK/STAT signalni put, a aktivira Nrf2 transdukcioni put, a na taj način ispoljava anti-inflamatorno delovanje (Nunes i sar., 2015). Nealkoholni ekstrakt vina „Provinols™“ inhibira ekspresiju COX-2, kao i NF-κB signalnu kaskadu (Agouni i sar., 2017).

Osim povećane ekspresije COX-2, kroz ovaj signalni put može da se indukuje i ekspresija cPLA₂α nakon dodatka LPS (*Poglavlje 4.5.5.*), te postoji mogućnost da je smanjena ekspresija cPLA₂α upravo posledica inhibicije ovih signalnih kaskada.

Smatra se da su za biološki potencijal vina zaslužna polifenolna jedinjenja. U cilju određivanja korelacije između sadržaja različitih klasa polifenola, kao i dominantnih jedinjenja određenih na osnovu polifenolnog profila, i sposobnosti inhibicije produkcije PGE₂ i TXA₂ izračunati su *Pearsonovi* koeficijenti korelacije (*r*, *Tabela 6.20.*).

Tabela 6.20. Pearsonovi koeficijenti korelacije između polifenolnog profila i sposobnosti inhibicije produkcije PGE₂ i TXA₂

	Sposobnost inhibicije PGE ₂	Sposobnost inhibicije TXA ₂
	<i>r</i>	
Ukupni polifenoli	-0.019	0.481
Ukupni flavonoidi	-0.466	0.471
Ukupni tanini	-0.155	0.551
Ukupni monomerni antocijani	-0.193	0.357
Galna kiselina	0.064	-0.067
Kafena kiselina	-0.182	0.550
Katehin	0.047	0.218
Kvercetin	-0.368	0.591
Rezveratrol	0.052	0.178
Malvidin-3-O-glukozid	-0.030	0.216

Na osnovu vrednosti prikazanih u *Tabeli 6.20.* ne zapaža se korelacija između sadržaja ni jedne klase polifenolnih jedinjenja, kao ni pojedinačnih polifenola, i utvrđene biološke aktivnosti. Međutim, može se uočiti da, uz izuzetak galne kiseline, sva jedinjenja imaju veće koeficijente korelacije sa inhibicijom produkcije TXA₂ nego PGE₂. Rezultati pokazuju da je sadržaj određenih klasa polifenola, kao i pojedinačno kafene kiseline i kvercetina u slaboj do umerenoj, ali pozitivnoj, korelaciji sa stepenom inhibicije produkcije TXA₂.

S obzirom da je analiziran potencijal samo dva uzorka vina da moduliraju ekspresiju mRNK enzima uključenih u produkciju PGE₂ i TXA₂, nije moguće izračunati korelacione faktore između hemijskog sastava i ispoljenih aktivnosti.

Uopšteno, analizirana vina ispoljavaju bolju inhibiciju produkcije TXA₂ nego PGE₂. Nekoliko vina ima približno istu sposobnost inhibicije produkcije PGE₂ kao i aspirin pri koncentraciji od 25 μmol/L, dok aspirin poseduje bar dvostruko veći potencijal inhibicije TXA₂ u odnosu na sva analizirana vina. Vina su donekle supresovala uticaj LPS na ekspresiju cPLA₂α mRNK, jednog od ključnih enzima uključenih u produkciju PGE₂ i TXA₂. Na osnovu navedenih rezultata postoje indicije da modulacija ciklooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline može da bude jedan od mehanizama kardioprotektivnog delovanja vina.

6.5. Odabrani polifenoli kao modulatori produkcije PGE₂ i TXA₂

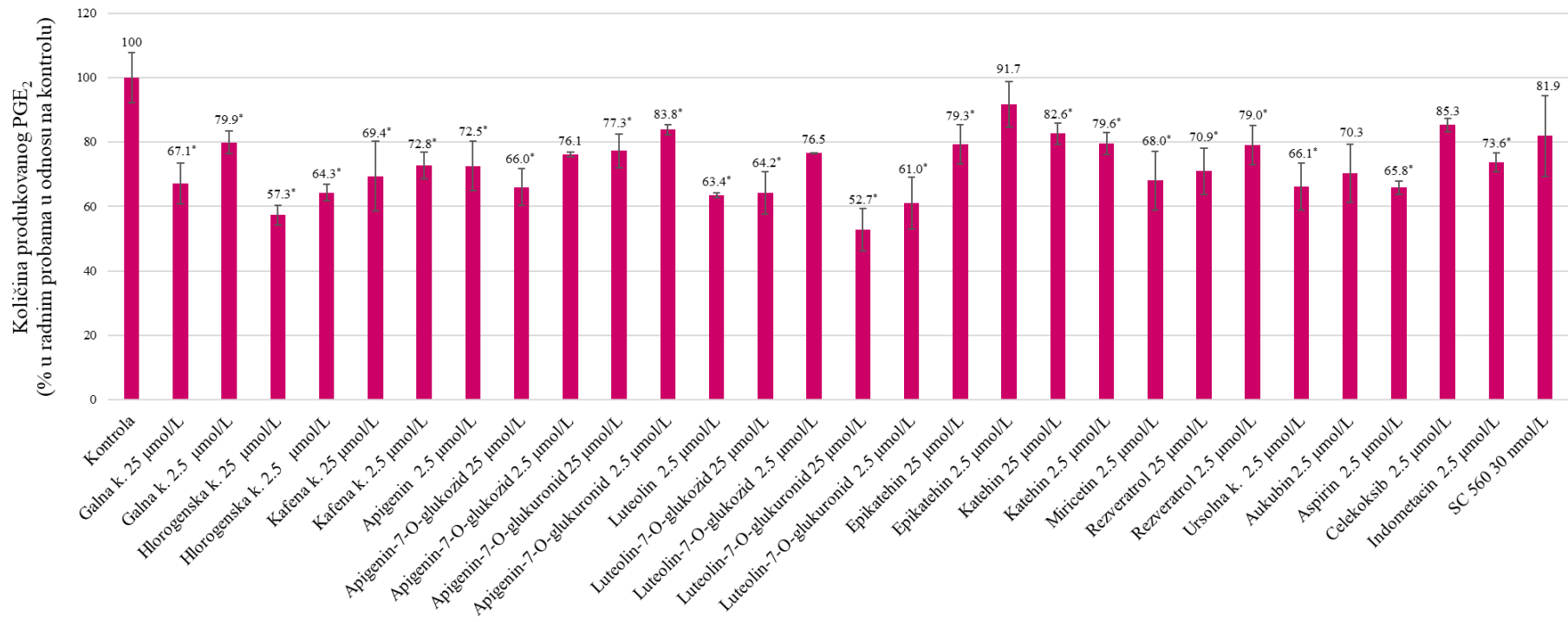
Ekstrakti bokvica i uzorci vina su ispoljili umereni potencijal inhibicije produkcije PGE₂ i TXA₂, koji je verovatno posledica sinergističkog delovanja prisutnih biološki aktivnih jedinjenja. Statističkom obradom podataka uglavnom je utvrđena slaba korelacija između ispoljene aktivnosti i sadržaja dominantnih jedinjenja, kako u bokvicama, tako i u vinima. Međutim, ostaje nedoumica da li odgovarajuća jedinjenja mogu samostalno da ispolje aktivnost u primenjenom model sistemu, odnosno da li pri primenjenim eksperimentalnim uslovima zaista doprinose datoj aktivnosti. Na primer, i crvena i bela vina su inhibirala aktivnost COX-1 i COX-2 na izolovanim enzimima, a od 33 analizirane polifenolne komponente prisutne u vinu, kada su one samostalno ispitivane, samo je rezveratrol ispoljio značajnu inhibiciju (Kutil i sar., 2014).

S obzirom da statistički rezultati ne pružaju podatke o stvarnoj aktivnosti pojedinačnih jedinjenja prisutnih u kompleksnim smešama, analiziran je uticaj odabranih jedinjenja, dominantnih i karakterističnih za ekstrakte bokvica i *Merlot* vina. Za većinu analiziranih prirodnih proizvoda postoje podaci o anti-inflamatornom delovanju u smislu inhibicije produkcije proizvoda makrofaga, ali gotovo da nema podataka o njihovoj interakciji sa monocitima u procesima inflamacije, pa je u ovom radu analiziran njihov uticaj u model sistemu nestimuliranih monocita (model homeostaze), kao i monocita u kojima je inflamacija izazvana dodatkom LPS (model rane faze inflamacije). U LPS-stimuliranim makrofagama, kao model sistemu u kom je proučavan uticaj vina na produkciju PGE₂ i TXA₂ u inflamaciji, ispitan je jedino navedeni potencijal odabranih polifenola, karakterističnih za *Merlot* vina.

6.5.1. Uticaj odabranih polifenola na produkciju PGE₂ i TXA₂ u monocitima

U LPS-nestimuliranim monocitima ispitan je sposobnost odabranih jedinjenja da inhibiraju aktivnost COX-1 i kuplovanih enzima koji su uključeni u produkciju PGE₂ i TXA₂ tokom homeostaze. Analizirane su tri fenolne kiseline (galna, hlorogenska i kafena), 2 flavona i po jedan njihov glukozid i metabolit (apigenin, apigenin-7-*O*-glukozid, apigenin-7-*O*-glukuronid, luteolin, luteolin-7-*O*-glukozid, luteolin-7-*O*-glukuronid), 2 flavan-3-ola (katehin i epikatehin), 1 flavonol (miricetin), 1 stilben (rezveratrol), 1 triterpenska kiselina (ursolna kiselina), 1 iridoid (aukubin) i 4 standardna inhibitora ciklooksigenaza (aspirin, celekoksib, indometacin i SC560).

Sva polifenolna jedinjenja koja nisu bila toksična pri koncentraciji od 25 µmol/L, ispitivana su u dve koncentracije: 25 µmol/L i 2.5 µmol/L, dok su jedinjenja koja su bila toksična pri koncentraciji 25 µmol/L analizirana samo pri nižoj koncentraciji (2.5 µmol/L). Uticaj odabranih jedinjenja i standardnih inhibitora ciklooksigenaze na produkciju PGE₂ i TXA₂ u nestimuliranim monocitima prikazan je na *Histogramu 6.25 i 6.26.*, redom.



Histogram 6.25. Uticaj odabranih jedinjenja na produkciju PGE₂[§] u nestimulisanim monocitima*

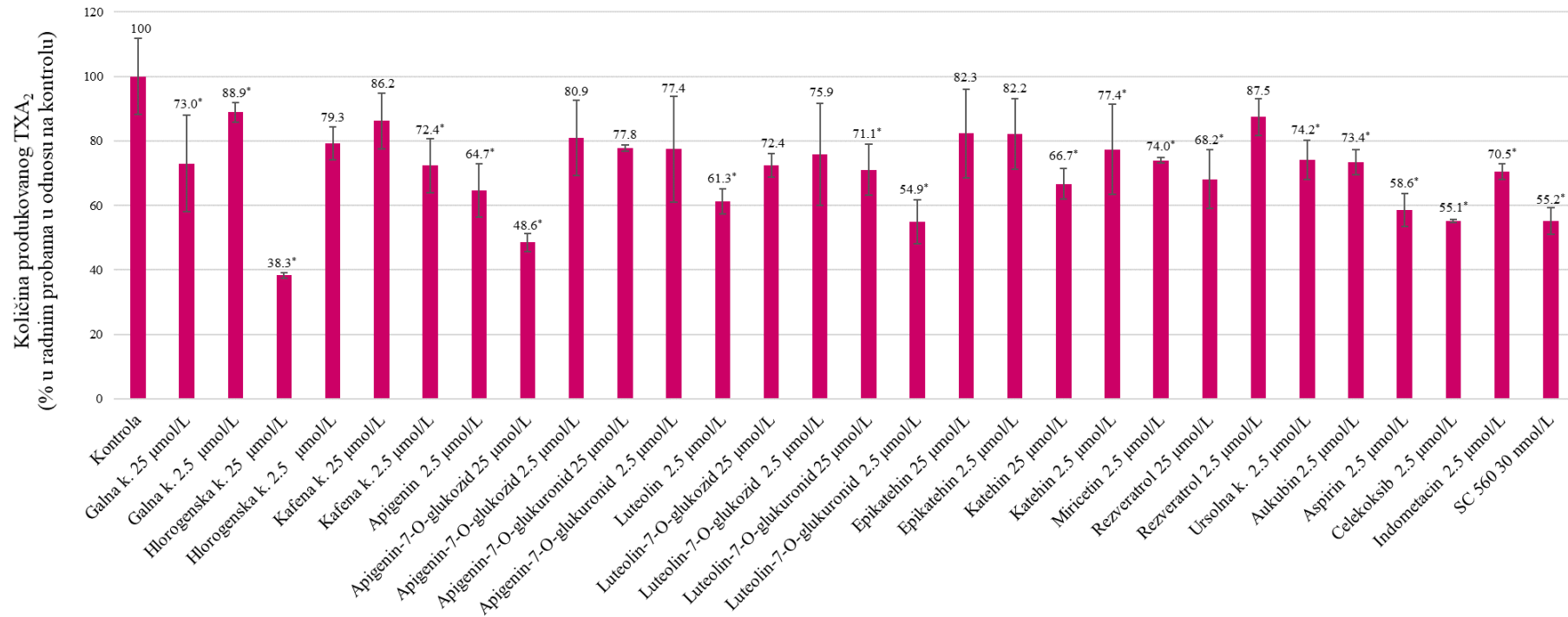
* statistički značajno različito od kontrole ($p \leq 0.05$); [§]Količina produkovanog PGE₂ (%) predstavlja odnos površine pikova PGE₂ i internog standarda PGB₂ u radnim probama i površine pikova PGE₂ i PGB₂ u kontroli.

U pogledu uticaja na produkciju PGE₂ uočava se da su ispitivana jedinjenja ispoljila inhibiciju u opsegu od 16.2 (apigenin-7-*O*-glukuronid, 2.5 μmol/L) do 47.3% (luteolin-7-*O*-glukuronid, 25 μmol/L). Apigenin-7-*O*-glukozid, luteolin-7-*O*-glukozid, epikatehin i aukubin nisu bili aktivni pri koncentraciji od 2.5 μmol/L, ali su ispoljili aktivnost pri deset puta većoj koncentraciji (25 μmol/L). Uopšteno, osim kod katehina, uočena je dozno zavisna aktivnost – analizirana polifenolna jedinjenja su pri višoj koncentraciji bila aktivnija. Međutim, zabeležena je statistički značajna razlika samo u slučaju galne kiseline i rezveratrola. Ni jedna klasa polifenolnih jedinjenja se posebno ne izdvaja po aktivnosti, a od pojedinačnih jedinjenja najbolju aktivnost su ispoljili hlorogenska kiselina i luteolin, kao i njegov glukozid i glukuronid.

U poređenju sa standardnim inhibitorima ciklooksigenaza, aspirinom i indometacinom, analizirana prirodna jedinjenja su ispoljila dobru aktivnost. Naime, samo tri polifenolna jedinjenja (apigenin-7-*O*-glukuronid, rezveratrol i epikatehin) su bila slabije aktivna od aspirina pri istoj radnoj koncentraciji, dok su sva jedinjenja ispoljila isti nivo aktivnost kao indometacin. Zanimljivo je da i celekoksib, selektivni inhibitor COX-2, i SC-560, selektivni inhibitor COX-1, nisu ispoljili statistički značajnu inhibiciju pri ispitanim koncentracijama. Međutim, usled velike citotoksičnosti, selektivni inhibitor SC-560 je analiziran pri skoro 100 puta nižoj koncentraciji u odnosu na sva druga jedinjenja, te ove rezultate nije moguće direktno porediti.

U primenjenom model sistemu, nakon dodatka arahidonske kiseline, pored produkcije PGE₂, u monocitima je povećana i produkcija TXA₂. S obzirom da je količina detektovanog TXB₂ niska i u kontrolama, to može da bude uzrok visokih standardnih devijacija koje se uočavaju na *Histogramu 6.26.*, na kojem su prikazani rezultati uticaja ispitivanih polifenolnih jedinjenja na produkciju TXA₂. Prilikom inhibicije produkcije TXA₂ (*Histogram 6.26.*) najbolju aktivnost su ispoljili hlorogenska kiselina i apigenin-7-*O*-glukozid koji su pri koncentraciji 25 μmol/L snizili produkciju TXA₂ na 38.3 i 48.6% u odnosu na količinu koja je produkovana u kontroli. Pri koncentraciji od 2.5 μmol/L, najbolju aktivnost ispoljio je luteolin-7-*O*-glukuronid, jedan od metabolita luteolina koji je detektovan u krvi, a čija aktivnost je do sada veoma slabo ispitana. U aktivnosti ga slede dva aglikona flavona, luteolin i apigenin. Među analiziranim polifenolnim jedinjenjima luteolin i luteolin-7-*O*-glukuronid bili najaktivniji prilikom inhibicije oba metabolita arahidonske kiseline.

Svi inhibitori ciklooksigenaza su redukovali produkciju TXA₂, pri čemu su najaktivniji bili celekoksib i SC-560 koji nisu uticali na produkciju PGE₂. Nasuprot prikazanim rezultatima, s obzirom da navedena jedinjenja predstavljaju inhibitore ciklooksigenaza, bilo je očekivano da ispolje sličnu aktivnost pri inhibiciji produkcije oba metabolita.



Histogram 6.26. Uticaj odabranih jedinjenja na produkciju TXA₂[§] u nestimulisanim monocitima*

* statistički značajno različito od kontrole ($p \leq 0.05$); §Količina proizvedenog TXA₂ (%) predstavlja odnos površine pikova TXA₂ i internog standarda PGB₂ u radnim probama i površine pikova TXA₂ i PGB₂ u kontroli.

Aspirin se u niskim koncentracijama primenjuje za sprečavanje tromboze, a u osnovi mehanizma ovog delovanja je upravo inhibicija aktivnosti COX-1 i shodno tome inhibicija produkcije TXA₂ u trombocitima. U primenjenom model sistemu, od ispitanih 15 prirodnih jedinjenja, samo tri jedinjenja (galna kiselina, katehin i rezveratrol) su ispoljila statistički slabiju aktivnost u odnosu na aspirin. Na osnovu ovde prikazanih rezultata postoje indicije da bi druga analizirana jedinjenja, posebno luteolin i luteolin-7-O-glukuronid takođe mogla da poseduju kardioprotektivno delovanje. Međutim, ovu hipotezu je neophodno ispitati primenom drugih *in vitro* (npr. humanih trombocita) i *in vivo* model sistema, ali i uz upotrebu osetljivijih metoda detekcije.

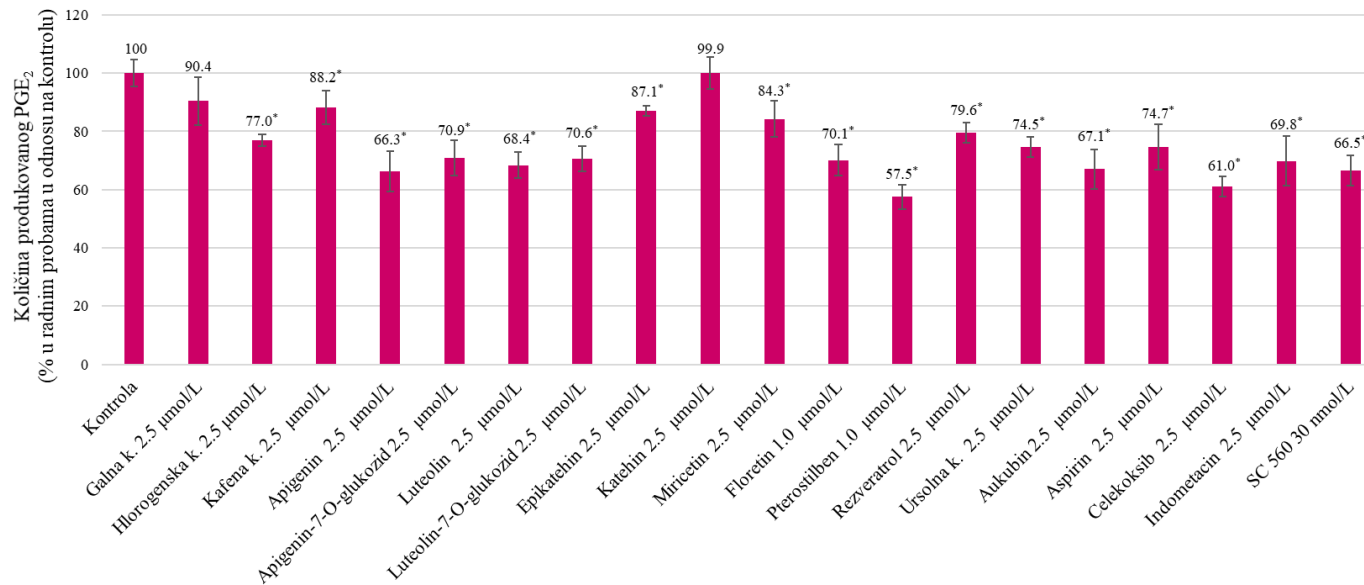
S obzirom da prikazani model sistem predstavlja uticaj na produkciju PGE₂ i TXA₂ tokom homeostaze, jedinjenja koja bi u ovom model sistemu snažno supresovala njihovu produkciju mogla bi da ispolje negativne efekte, jer navedeni metaboliti arahidonske kiseline imaju važne fiziološke funkcije. Međutim, sa druge strane, s obzirom da selektivni inhibitori COX-2 ispoljavaju neželjene efekte u kardiovaskularnom sistemu jer narušavaju odnos PGI₂ i TXA₂, jedinjenja koja bi ispoljila delovala na COX-2, a istovremeno snizila produkciju TXA₂, mogu da predstavljaju zanimljive kandidate za dalja istraživanja.

U cilju određivanja uticaja odabranih polifenola, aukubina i ursolne kiseline, na produkciju PGE₂ i TXA₂ u inflamaciji, njihova aktivnost je ispitana i u monocitima u kojima je inflamacija indukovana dodatkom LPS. Kao što je prethodno navedeno, u ovom model sistemu, obe izoforme cikloooksigenaza doprinose količini produkovanih metabolita arahidonske kiseline, a osim efekta na količinu produkovanog PGE₂ i TXA₂, analizirana je i sposobnost modulacije ekspresije mRNK svih enzima koji su uključeni u njihovu produkciju.

S obzirom da su u nestimulisanim monocitima jedinjenja koja su testirana pri koncentracijama od 25 µmol/L i 2.5 µmol/L ispoljila približnu aktivnost, u LPS-stimulisanim monocitima testirana su samo pri nižoj koncentraciji. Pretpostavlja se da će ispitivane supstance ispoljiti sličan ili bolji potencijal i pri višoj koncentraciji. Takođe, treba ueti u obzir činjenjicu da polifenolna jedinjenja podležu složenim biotransformacijama tokom apsorpcije u gastrointestinalnom traktu, te da su u krvi prisutni u veoma niskim koncentracijama, znatno nižim i od 2.5 µmol/L.

Za razliku od eksperimenata u nestimulisanim monocitima, u monocitima stimulisanim dodatkom LPS nije ispitano uticaj glukuronida apigenina i luteolina na produkciju, već samo na ekspresiju enzima uključenih u produkciju PGE₂ i TXA₂. Međutim, u ovom model sistemu su testirana dva polifenolna jedinjenja koja nisu ispitana u nestimulisanim monocitima: floretin (dihidrohalkon) i pterostilben (stilben). Aktivnost ovih jedinjenja je ispitana u okviru šireg istraživanja biološkog potencijala floretina i pterostilbena koje je urađeno u saradnji sa profesorom Lucianom Sasom sa Univerziteta Sapienza u Rimu. Za razliku od drugih jedinjenja, ova dva jedinjenja su analizirana pri nižoj koncentraciji (1 µmol/L).

Na *Histogramu 6.27* prikazana je sposobnost odabranih jedinjenja kao potencijalnih modulatora produkciju PGE₂ u LPS-stimulisanim monocitima. Od 19 analiziranih jedinjenja, samo dva, galna kiselina i katehin, nisu redukovala produkciju PGE₂ u odnosu na kontrolu.



Histogram 6.27. Uticaj odabranih jedinjenja na produkciju PGE₂[§] u LPS-stimulisanim monocitima*

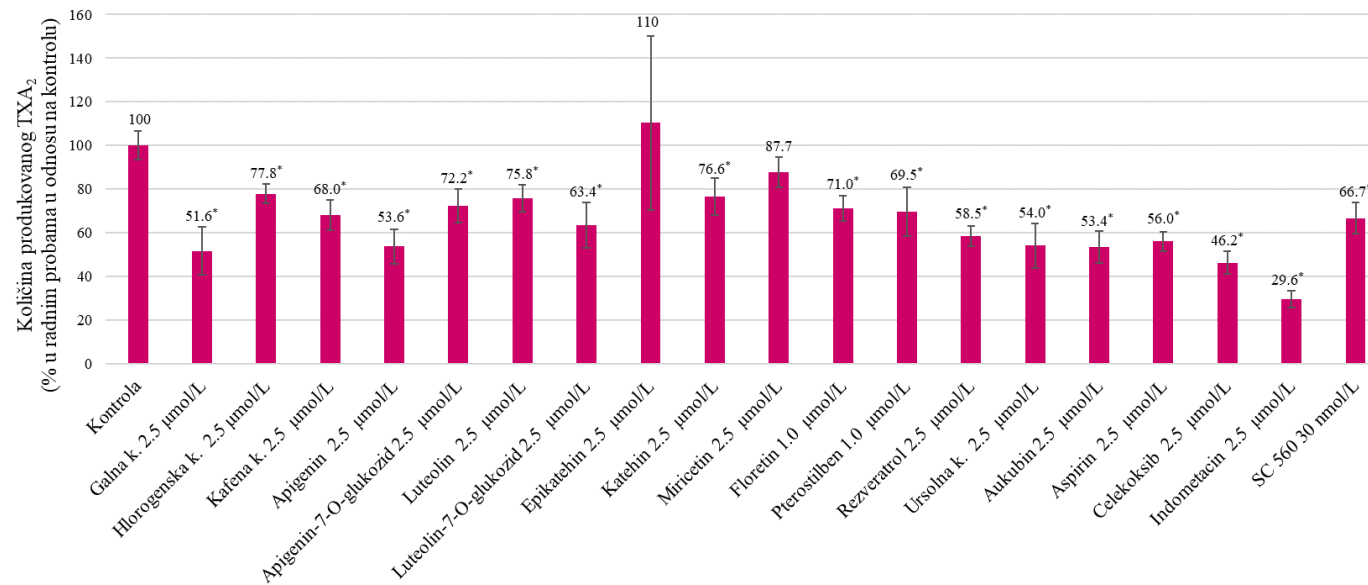
*statistički značajno različito od kontrole ($p \leq 0.05$); [§]Količina produkovanog PGE₂ (%) predstavlja odnos površine pikova PGE₂ i internog standarda PGB₂ u radnim probama i površine pikova PGE₂ i PGB₂ u kontroli.

Inhibitorni potencijal aktivnih jedinjenja bio je u opsegu od 11.8% koliko je ispoljila kafena kiselina (2.5 $\mu\text{mol/L}$) do 42.5% koliko je ispoljio pterostilben (1 $\mu\text{mol/L}$). Uopšteno pterostilben i floretin su bili najaktivniji, a aktivnost koju su ispoljili je bila u rangu aktivnosti standardnih inhibitora ciklooksigenaza primenjenih pri 2.5 puta većoj koncentraciji. Zanimljivo je da je pterostilben bio znatno aktivniji od rezveratrola, stilbena koji je poznat po svojoj biološkoj aktivnosti. Ovi rezultati su bili u skladu sa rezultatima prethodno objavljene studije (Chiou i sar., 2011).

Na osnovu priloženog *Histograma 6.27.*, uočava se da su od jedinjenja analiziranih pri koncentraciji 2.5 $\mu\text{mol/L}$, flavoni pokazali malo bolju aktivnost u odnosu na druge klase polifenolnih jedinjenja. Analogno aktivnosti u nestimulisanim monocitima, luteolin se i u ovom model sistemu izdvojio kao jedno od najaktivnijih jedinjenja. Takođe, hlorogenska kiselina je i u LPS-stimulisanim monocitima bolje inhibirala produkciju PGE_2 u odnosu na galnu i kafenu kiselinu.

Rezultati *ex vivo* studije su pokazali da je u humanim monocitima stimulisanim LPS-om produkcija PGE_2 u korelaciji sa faktorima rizika za oboljevanje od kardiovaskularnih bolesti, kao što su pušenje ili dijabetes melitus. Takođe, produkcija PGE_2 je bila u korelaciji sa debljinom intime-medije karotidnih arterije, što predstavlja jedan od markera subkličičke ateroskleroze (Beloqui i sar., 2005). Na osnovu navedenog, postoje indicije da jedinjenja koja su ispoljila sposobnost inhibicije PGE_2 u ovom model sistemu ispoljavaju potencijalno kardioprotektivno delovanje.

U pogledu uticaja na produkciju TXA_2 (*Histogram 6.28*) uočava se da su jedinjenja ispoljila drugačiji redosled aktivnost u odnosu na inhibiciju produkcije PGE_2 . Naime, od polifenolnih jedinjenja najbolju sposobnost redukcije produkcije TXA_2 ispoljila je galna kiselina, koja nije inhibirala sintezu PGE_2 .



Histogram 6.28. Uticaj* odabranih jedinjenja na produkciju TXA₂[§] u LPS-stimulisanim monocitima

*statistički značajno različito od kontrole ($p \leq 0.05$); [§]Količina produkovanog TXA₂ (%) predstavlja odnos površine pikova TXB₂ i internog standarda PGB₂ u radnim probama i površine pikova TXB₂ i PGB₂ u kontroli

Osim galne kiseline, i aktivnost apigenina, rezveratrola, ursolne kiseline i aukubina je bila u istom nivou kao i aktivnost standardnih inhibitora ciklooksigenaza, sa vodećim indometacinom. Svi navedeni prirodni proizvodi su ispoljili bolji potencijal inhibicije produkcije TXA₂ nego PGE₂. Samo dva jedinjenja nisu uticala na produkciju TXA₂.

U pogledu aktivnosti standardnih inhibitora ciklooksigenaza dobijeni su neočekivani rezultati. Naime, uočava se da aspirin, celekoksib i indometacin u oba navedena model sistema bolje inhibiraju produkciju TXA₂ nego PGE₂. Sa druge strane, SC-560 je u nestimulisanim monocitima statistički značajno redukovao samo produkciju TXA₂ u odnosu na kontrolu (55.2%), dok je u LPS-stimulisanim monocitima približno inhibirao produkciju oba metabolita. U prethodnoj studiji je pokazano da SC-560 u humanim monocitima ne ispoljava selektivnost ka inhibiciji COX-1 u odnosu na COX-2 (Brenneis i sar., 2006), stoga to može da bude objašnjenje ispoljene inhibicije na LPS-stimulisanim monocitima, ali ostaje nejasno zašto u nestimulisanim monocitima nije inhibirana produkcija PGE₂.

Zanimljivo je da hlorogenska kiselina ostvaruje istu sposobnost inhibicije oba metabolita, dok sa druge strane, manje voluminozne fenolne kiseline, galna i kafena, snažnije inhibiraju produkciju TXA₂ nego PGE₂. Na osnovu uočenog, može da se pretpostavi da je prostor aktivnog centra TXAS možda manji i omogućava vezivanje samo galne i kafene, a ne i hlorogenske kiseline. Naravno, neophodne su studije molekuskog modelovanja kojima bi se ispitala navedena hipoteza.

U eksperimentalnim uslovima koji odgovaraju homeostazi, ursolna kiselina je bolje inhibirala produkciju PGE₂, nego TXA₂, dok nakon izazivanja inflamacije 20% snažnije supresuje produkciju TXA₂ nego PGE₂. Takođe, efekat na produkciju TXA₂ je jači u stimulisanim (46% inhibicije) u odnosu na nestimulisane monocite (25.6% inhibicije), dok je u slučaju PGE₂ obrnuto (25.5% i 33.9% inhibicije). U ispitivanjima na izolovanim COX-1 i COX-2 enzimima ursolna kiselina izolovana iz vrste *P. major* je označena kao selektivni inhibitor COX-2, iako je odnos IC₅₀ vrednosti za aktivnosti COX-2/COX-1 iznosio samo 0.6 (Ringbom i sar., 1998), što znači da ursolna kiselina zapravo inhibira obe izoforme.

Aukubin u nestimulisanim monocitima ispoljava isti potencijal inhibicije oba metabolita, dok u LPS-stimulisanim monocitima bolje inhibira produkciju TXA₂ nego PGE₂. Za razliku od rezultata prethodne studije (Park i sar., 2010), u kojoj je aukubin ispoljio veći potencijal ka inhibiciji COX-2 u odnosu na COX-1, u našim istraživanjima nije uočena razlika u uticaju aukubina na produkciju PGE₂ koji potiče samo od COX-1 ili od obe izoforme.

Usled kontraindikacija upotrebe postojećih COX-1 i COX-2 inhibitora, polifenolna jedinjenja već dve decenije predstavljaju predmet intenzivnih istraživanja. Zbog velike zastupljenosti u biljkama, za većinu jedinjenja koja su ispitana u okviru ove doktorske disertacije postoje podaci o uticaju na produkciju PGE₂ i ekspresiju COX-2, kao jednog od mehanizama anti-inflamatornog delovanja. Na osnovu rezultata *in vivo* studija evidentno je da apigenin (He i sar., 2019), luteolin (He i sar., 2019; Park i Song, 2019) i luteolin-7-*O*-glukozid (Park i Song, 2019), hlorogenska kiselina (Xu i sar., 2010) ili rezveratrol (Cui i sar., 2010; Chen i sar., 2014) ispoljavaju anti-inflamatorno delovanje, a da je jedan od mehanizama i modulacija metabolizma arahidonske kiseline, odnosno

inhibicija ekspresije COX-2 i posledično inhibicija produkcije PGE₂. Međutim, u zavisnosti od eksperimentalnih uslova, korišćenog model sistema, vremena inkubacije i primenjenih koncentracija podaci o aktivnoj koncentraciji su veoma različiti.

Pored mnogobrojnih studija u kojima su analizirana pojedinačna jedinjenja, ili jedinjenja zastupljena u određenim biljnim vrstama, u nekoliko studija je analiziran veliki broj jedinjenja kako bi se utvrdile strukturne karakteristike neophodne za inhibiciju aktivnosti COX-1/2 enzima. Riberio i saradnici (2014) su ispitali uticaj 17 flavonoida, uključujući apigenin i luteolin, na aktivnost COX-1 i COX-2 enzima u punoj krvi. Takano-Ishikawa i saradnici (2006) su analizirali 39 polifenolnih jedinjenja korišćenjem primarnih mišijih makrofaga kao model sistema. Predmet njihovog istraživanja je bio uticaj na produkciju PGE₂ i ekspresiju COX-2 proteina, a među ispitivanim jedinjenjima nalazila su se i neka jedinjenja analizirana u okviru ove doktorske disertacije: apigenin, luteolin, miricetin, katehin, epikatehin, hlorogenska kiselina, floretin i rezveratrol. Takođe, neka od jedinjenja koja su analizirana u okviru ove disertacije (apigenin, luteolin, katehin, epikatehin i miricetin), bila su uključena i u studiju koja se bavila proučavanjem dejstva 26 flavonoida na produkciju PGE₂, ekspresiju mRNK i proteina COX-2, i mRNK mPGES-1 (Hämäläinen i sar., 2011).

Iako su sva istraživanja rađena *in vitro*, na ćelijama krvi, postoje velika neslaganja kako između rezultata ove disertacije i navedenih radova, tako i između samih navedenih radova. Na primer, u radu Hämäläinen i saradnika (2011), luteolin i apigenin su isključeni iz istraživanja zbog citotoksičnosti pri 100 µmol/L. U studiji na primarnim mišijim makrofagama, apigenin se izdvojio kao jedno od najaktivnijih jedinjenja, dok luteolin nije bio aktivan (Takano-Ishikawa i sar., 2006). Nasuprot tome, rezultati eksperimenata u humanoj krvi pokazuju da je luteolin bolji inhibitor COX-2 nego COX-1, i da je u oba slučaja aktivniji od apigenina, koji ispoljava samo inhibiciju COX-2 (Riberio i sar., 2014). Na osnovu rezultata prikazanih na *Histogramima* 6.25. i 6.26., uočava se da je luteolin u odnosu na apigenin neznatno bolje inhibirao produkciju PGE₂ (36.6% i 27.5%, redom) i TXA₂ (38.7% i 35.3%), uslovljenu delovanjem COX-1. Sa druge strane, u LPS-stimulisanim monocitima kada metaboliti potiču od aktivnost obe COX izofrome, apigenin i luteolin inhibiraju produkciju PGE₂ 33.7% i 31.6%, redom, dok apigenin, znatno bolje od luteolina, inhibira produkciju TXA₂ (46.4% i 24.2%).

U radu Takano-Ishikawa i saradnika (2006) najaktivnija klasa fenolnih jedinjenja su bili flavoni i flavanoni, dok antocijani, flavan-3-oli i antocijanidini nisu ispoljili aktivnost. Takođe, i pri koncentraciji 100 µmol/L, flavan-3-oli su bili manje aktivni od flavona (Hämäläinen i sar., 2011). U okviru naših istraživanja, primenjene su mnogo niže koncentracije, ali se uočava da su, iako sa statistički neznačajnim razlikama, flavoni (apigenin, luteolin i njihovi glukozidi) ispoljili najbolju aktivnost, dok su flavan-3-oli bili najmanje aktivni (*Histogram* 6.27).

U prethodnoj studiji luteolin, miricetin, katehin, epikatehin, hlorogenska kiselina i floretin se navode kao neaktivni, jer nisu postigli 50% inhibicije produkcije PGE₂ pri koncentracijama do 1000 µmol/L (Takano-Ishikawa i sar., 2006), dok je u radu Hämäläinen i saradnika (2011) miricetin povećao produkciju PGE₂. Pri koncentracijama korišćenim u okviru naših istraživanja, sva jedinjenja su ispoljila inhibiciju produkcije PGE₂, pri čemu su luteolin i floretin bili među aktivnijim jedinjenjima.

Uz izuzetak delovanja luteolina i luteolin-7-*O*-glukozida na produkciju TXA₂ u LPS-stimulisanim monocitima, aglikoni flavona, apigenin i luteolin su ispoljili bolju aktivnost u odnosu na odgovarajuće glukozide. Ovi rezultati su u skladu sa ispitivanjima u kojima su kvercitrin i rutin ispoljili slabiju aktivnost u odnosu na kvercetin, a gde se kao jedan od potencijalnih razloga ove razlike navodi smanjena permeabilnost glikozida kroz ćelijske membrane (Takano-Ishikawa i sar., 2006).

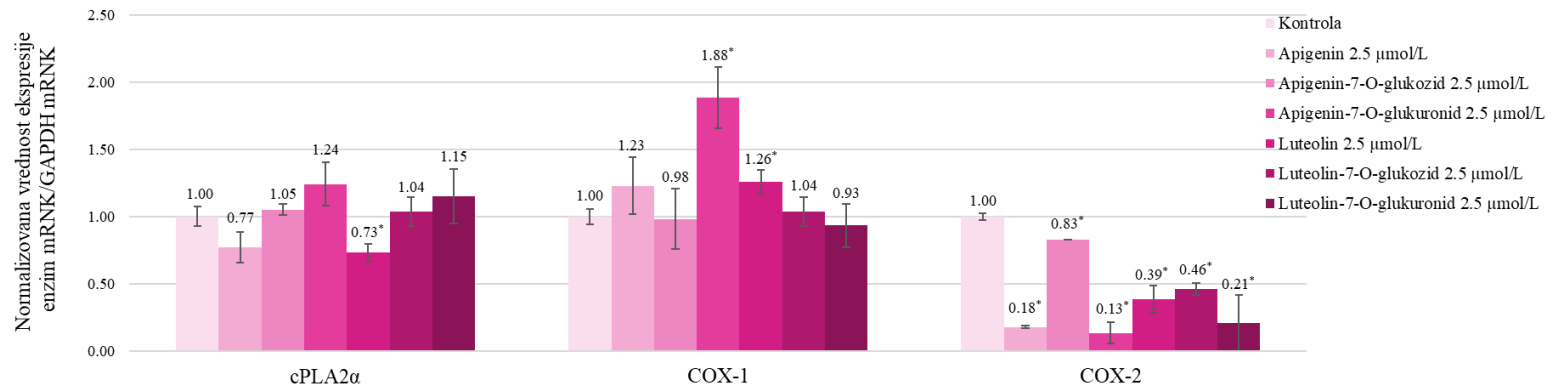
Iako se različit uticaj na produkciju PGE₂ u model sistemima u kojima je dominantna COX-1, odnosno COX-2, često povezivao sa selektivnošću ka jednom od navedenih enzima, usled kompleksnih puteva uključenih u produkciju ova dva metabolita u ćelijama, prikazani rezultati ne mogu da govore o potencijalnom delovanju polifenolnih jedinjenja kao selektivnih inhibitora ciklooksigenaza.

Nasuprot evaluaciji uticaja na produkciju PGE₂, uticaj polifenolnih jedinjenja na produkciju TXA₂ bio je predmet znatno manjeg broja istraživanja, a najčešće je bio povezan s ispitivanjem uticaja na agregaciju trombocita. Naime, s obzirom da je agregacija trombocita povezana sa trombozom, aterosklerozom i drugim kardiovaskularnim bolestima, smatra se da bi inhibicija agregacije trombocita prirodnim jedinjenjima mogla da predstavlja jedan od načina prevencije kardiovaskularnih bolesti (Nardini i sar., 2007). Usled rasprostranjenosti kardiovaskularnih bolesti inhibicija agregacije trombocita prirodnim proizvodima je veoma aktuelan predmet istraživanja.

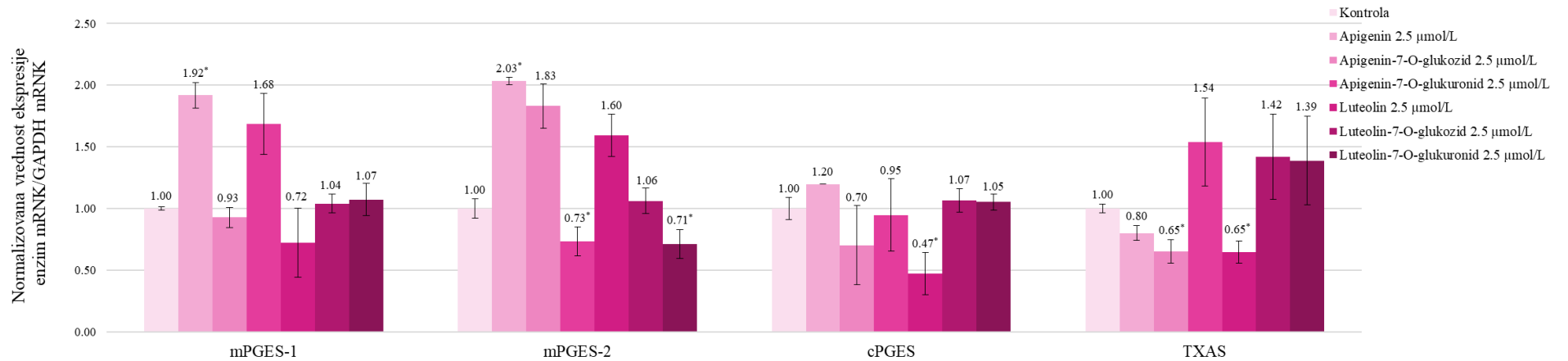
U radu Guerrero i sar. (2005) ispitano je 9 jedinjenja, čiji se potencijal razlikovao u zavisnosti od primenjenih stimulusa za agregaciju trombocita. Ukoliko se produkcije TXA₂ indukuje kolagenom, apigenin i luteolin ispoljavaju sličan efekat smanjujući produkciju TXA₂, a sa druge strane, ukoliko se koristi arahidonska kiselina, deluje da luteolin smanjuje, a apigenin povećava produkciju TXA₂, međutim, usled velikih standardnih devijacija ne može da se izvuče jasan zaključak. Oba jedinjenja snažno intereaguju sa TXA₂ receptorom. Katehin je ispoljio slabiju aktivnost u odnosu na apigenin i luteolin. Ukoliko se uporede navedeni rezultati sa uticajem apigenina, luteolina i katehina na produkciju TXA₂ u monocitima i LPS-stimulisanim monocitima, razlike u aktivnosti navedenih jedinjenja su znatno manje nego u navedenom radu.

I u radu Karličková i saradnika (2015) je proučavan uticaj 29 flavonoida na agregaciju trombocita kroz uticaj na inhibiciju COX-1 i TXAS koji su uključeni u produkciju TXA₂ i kroz uticaj na interakcije sa receptorima za TXA₂. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da jedino genistein i daidzein inhibiraju COX-1. Sa druge strane, 7-hidroksiflavin, apigenin i epikatehin su najbolje inhibirali aktivnost TXAS. Ni ovde navedeni rezultati nisu u skladu sa rezultatima ove teze u kojima je epikatehin bio najmanje aktivan. Međutim, uočavaju se i odstupanja između rezultata dva navedena istraživanja. Iako je u oba rada apigenin bio jedan od najboljih antagonista TXA₂ receptora, u radovima Guerrero i sar. (2005) i Navarro-Nunez i sar. (2009) navode da glikozidi imaju manju aktivnost, dok je u radu Karličková i saradnika (2015) apigenin-7-*O*-glukozid jedan od flavonoida koji su nasnažnije intereagovali sa receptorima. Ostaje pitanje da li se može uočiti realan inhibitorski efekat na produkciju TXA₂ ukoliko neko polifenolno jedinjenje kao što je apigenin intereaguje i sa receptorom za TXA₂, i time sprečava vezivanje TXA₂.

Kako bi se utvrdio da li je jedan mogućih od mehanizama kojim polifenolna jedinjenja utiču na produkciju PGE₂ i TXA₂ modulacija ekspresije mRNK enzima uključenih u njihovu produkciju, primenom RT-qPCR ispitan je uticaj odabranih jedinjenja na ekspresiju mRNK cPLA₂α, COX-1/2, mPGES-1, mPGES-2, cPGES i TXAS. Rezultati normalizovani na mRNK GAPDH, a zatim na kontrolu prikazani su na *Histogramima 6.29-6.34*. Iako dodatak LPS ne povećava ekspresiju mRNK svih enzima, postoji mogućnost da analizirana jedinjenja utiču na ekspresiju mRNK i enzima koji nisu inducibini, što posledično može da utiče i na količinu PGE₂ i TXA₂



Histogram 6.29. Uticaj* odabranih flavona na ekspresiju cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK u LPS-stimulisanim monocitima
*statistički značajno različito od kontrole (p ≤ 0.05)



Histogram 6.30. Uticaj* odabranih flavona na ekspresiju mPGES-1, mPGES-2, cPGES i TXAS mRNK u LPS-stimulisanim monocitima
*statistički značajno različito od kontrole (p ≤ 0.05)

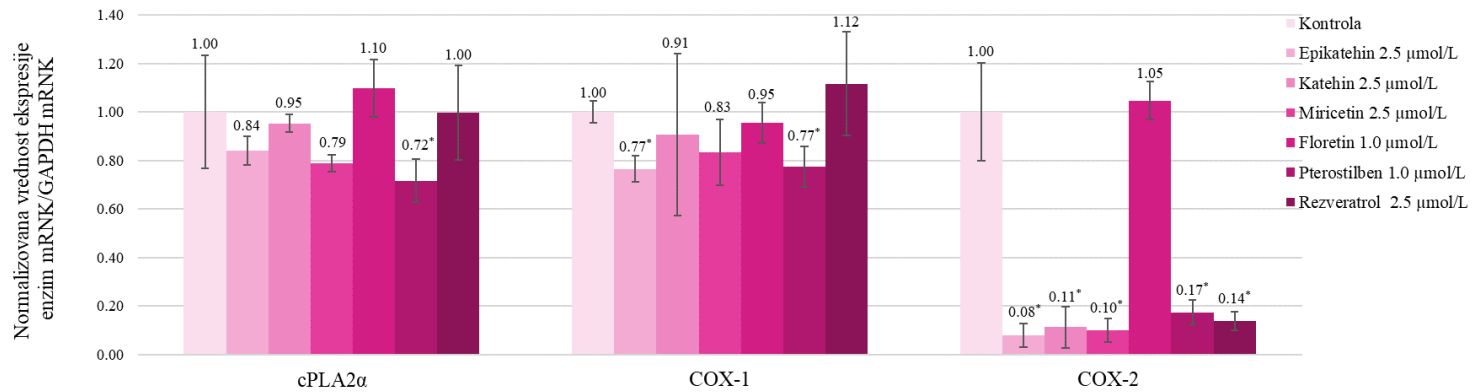
Na osnovu prikazanih rezultata zapaža se da je luteolin smanjio ekspresiju mRNK cPLA₂ α , enzima koji ima ključnu ulogu u oslobađanju arahidonske kiseline u inflamaciji. Apigenin-7-*O*-glukuronid i luteolin su povećali ekspresiju COX-1 mRNK. Sa druge strane, svi flavoni su snizili ekspresiju COX-2 mRNK pri čemu se uočava isti redosled i kod apigenina i kod luteolina: najaktivniji su glukuronidi, zatim aglikoni, dok su glukozidi najmanje aktivni.

I u prethodnim studijama je utvrđen inhibitorni efekat flavona na ekspresiju COX-2 (Raso i sar., 2001; Chen i sar., 2007; Kang i sar. 2009a; Marquez-Flores i sar., 2016). Takođe, navedeno je da apigenin snažno inhibira ekspresiju COX-2, a ne utiče na ekspresiju COX-1 proteina (Takano-Ishikawa i sar., 2006), što je u skladu sa ispoljenim efektom na nivou mRNK ovih proteina. Sa druge strane, biološka aktivnost, a time i uticaj glukuronida na ekspresiju COX-2 je znatno slabije proučen. Rezultati prethodnih studija pokazuju da apigenin-7-*O*-glukuronid izolovan iz vrste *Juglans sigillata* Dode inhibira produkciju PGE₂ (25 μ mol/L) i ekspresiju COX-2 mRNK (100 μ mol/L) u RAW 264.3 makrofagama delujući na MAPK signalnu kaskadu (Hu i sar., 2016). Takođe, pokazano je da i luteolin-7-*O*-glukuronid snižava ekspresiju mRNK (10 μ mol/L) i proteina COX-2 (20 μ mol/L) delujući na MAPK i NF- κ B signalnu kaskadu sprečavajući fosforilaciju TAK1 (Cho i sar., 2020).

Flavoni, apigenin i luteolin, su jedni od retkih jedinjenja čiji je uticaj na ekspresiju mPGES-1 mRNK prethodno ispitan. U rezultatima prikazanim na *Histogramu 6.30*. uočava se da imaju suprotan efekat, odnosno da apigenin indukuje ekspresiju mRNK mPGES-1. Prikazani rezultati nisu u potpunosti u skladu sa prethodno objavljenim radovima, u kojima su i apigenin (Marquez-Flores i sar., 2016) i luteolin snizili ekspresiju mPGES-1 (Wang i sar., 2007). Hämäläinen i saradnici (2011) su analizirali uticaj nekoliko flavonoida na produkciju PGE₂, ekspresiju mRNK i proteina COX-2, i mPGES-1 mRNK. Jedno od ispitivanih jedinjenja bio je luteolin-7-*O*-glukozid za koji je dokazano da pri koncentraciji od 100 μ mol/L inhibira ekspresiju mPGES-1 mRNK (21.3%) i povećava ekspresiju mRNK COX-2, a ovakav efekat nije zabeležen pri koncentraciji od 2.5 μ mol/L, primenjenoj u našim ispitivanjima.

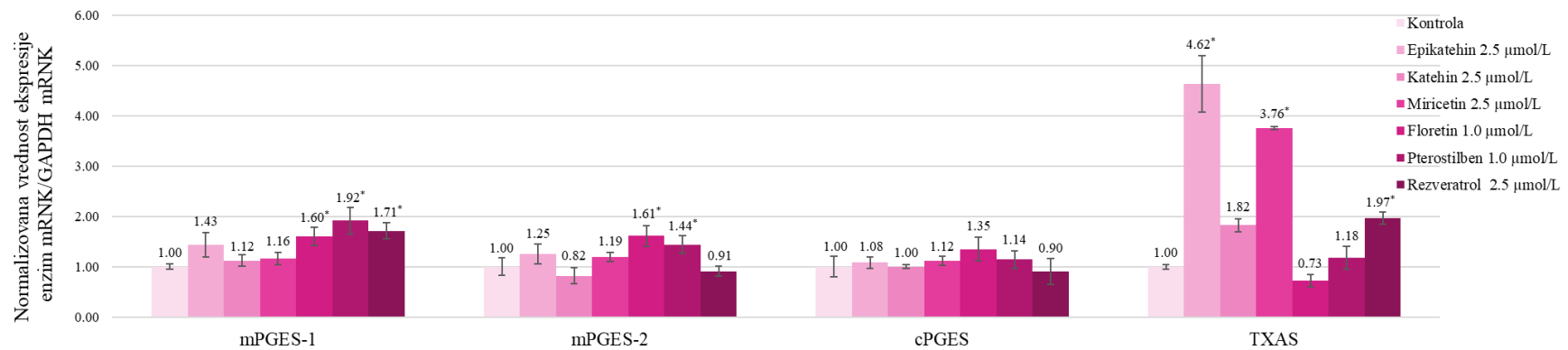
Zanimljivi su rezultati uticaja flavona na ekspresiju mPGES-2 mRNK, jer su je glukuronidi redukovali, dok su je glukozidi i aglikoni povećali, pri čemu je jedino uticaj apigenina na povećanje ekspresije statistički značajan. U pogledu uticaja na ekspresiju TXAS mRNK, jedino je značajan efekat apigenin-7-*O*-glukozid i luteolina koji su je redukovali. Na osnovu prikazanih rezultata, uočava se da aglikoni, glukozidi i glukuronidi istog flavona mogu da imaju potpuno suprotno dejstvo na jedan signalni put. S obzirom da tokom apsorpcije dolazi do njihove međusobne konverzije, neophodno je ispitati aktivnost različitih derivata.

Na *Histogramima 6.31*. i *6.32*. prikazan je uticaj odabranih flavan-3-ola, stilbena i dihidroalkona floretina na ekspresiju mRNK enzima uključenih u produkciju PGE₂ i TXA₂.



Histogram 6.31. Uticaj* odabranih flavan-3-ola, flavonola, dihidrohalkona i stilbena na ekspresiju cPLA2α, COX-1 i COX-2 mRNK u LPS-stimulisanim monocitima

*statistički značajno različito od kontrole($p \leq 0.05$)



Histogram 6.32. Uticaj* odabranih flavan-3-ola, flavonola, dihidrohalkona i stilbena na ekspresiju mPGES-1, mPGES-2, cPGES, TXAS mRNK u LPS-stimulisanim monocitima

*statistički značajno različito od kontrole($p \leq 0.05$)

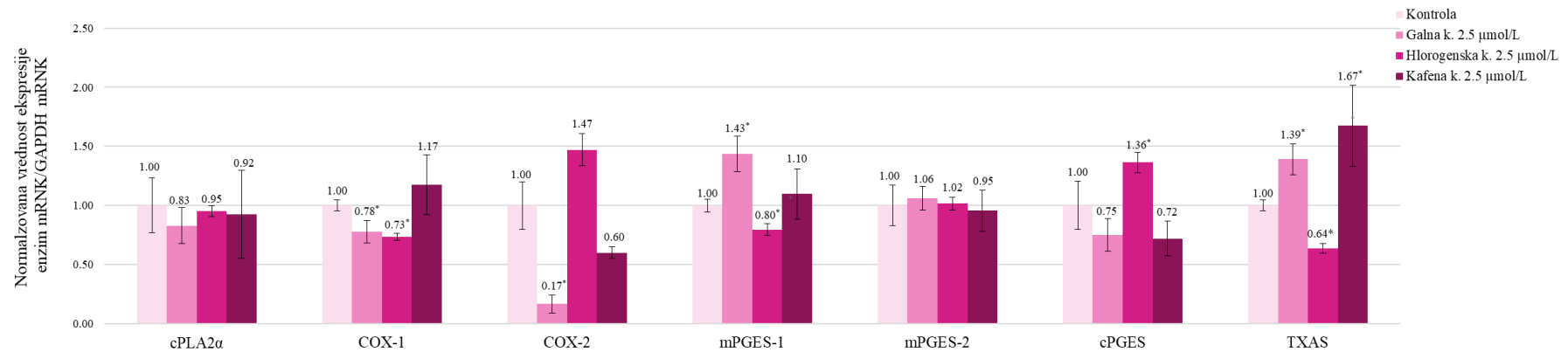
Analizirani flavan-3-oli (katehin i epikatehin) i flavonol (miricetin) su ispoljili sličnu aktivnost u pogledu inhibiciju ekspresije cPLA₂ α i COX-1 mRNA, koju je samo epikatehin redukovao. Sva tri jedinjenja su snažno supresovala ekspresiju COX-2 mRNA u odnosu na kontrolu: epikatehin 12 puta, miricetin 10 puta, a katehin 9 puta. Ni jedno od ovih jedinjenja nije imalo značajan uticaj na ekspresiju mRNA terminalnih enzima uključenih u produkciju PGE₂, a epikatehin i miricetin su povećali ekspresiju TXAS mRNA. Može da se pretpostavi da je upravo povišena ekspresija TXAS usled delovanja epikatehina (4.6 puta) i miricetina (3.8 puta) uzrok velike količine TXA₂ u probama tretiranim ovim jedinjenjima.

Stilbeni, pterostilben i rezveratrol, imaju sličan nivo delovanja na ekspresiju mRNA enzima uključenih u produkciju PGE₂ i TXA₂. Najveća razlika je uočena kod uticaja na ekspresiju cPLA₂ α i COX-1 mRNA, koje je pterostilben smanjio, odnosno mPGES-2, koju je povećao. S obzirom da ova dva jedinjenja imaju sličan uticaj na ekspresiju drugih enzima uključenih u produkciju PGE₂, postoje indicije da je navedni uticaj razlog zašto je pterostilben bolje inhibirao produkciju PGE₂. Zanimljivo je da je rezveratrol skoro dvostruko povećao ekspresiju TXAS, a sa druge strane smanjio produkciju TXA₂. Kako je pterostilben analiziran pri 2.5 puta nižoj koncentraciji, njegov modulatorni potencijal ciklooksigenaznog puta arahidonske kiseline je znatno snažniji.

I u *in vivo* istraživanjima, nakon azoksimetanom indukovanoj tumora kolona, dokazano je da pterostilben ispoljava bolje hemopreventivno delovanje nego rezveratrol, a jedan od mehanizama obuhvata i bolju redukciju ekspresije COX-2 (Chiou i sar., 2011). Sa druge strane, u radu Candelario-Jalil i sar. (2007) pokazano je da rezveratrol u primarnim mikroglijama pacova smanjuje produkciju PGE₂, kako onog koji nastaje delovanjem COX-1, tako i onog koji nastaje u ćelijama koje su tretirane LPS-om i kada su prisutne obe COX izoforme, i COX-1 i COX-2. Međutim, u navedenom radu rezveratrol u opsegu koncentracija od 1.00 do 50.0 μ mol/L nije smanjio ekspresiju COX-2, ni na nivou mRNA ni na nivou proteina, dok je već pri koncentraciji od 5.00 μ mol/L redukovao ekspresiju mRNA i proteina mPGES. Potencijalni razlog ovako različitih rezultata može da bude što su ovi istraživači koristili primarne mikroglijama pacova, a ranije je pokazano da postoje intraspecijske razlike između humanih i ćelija pacova u pogledu mPGES-1.

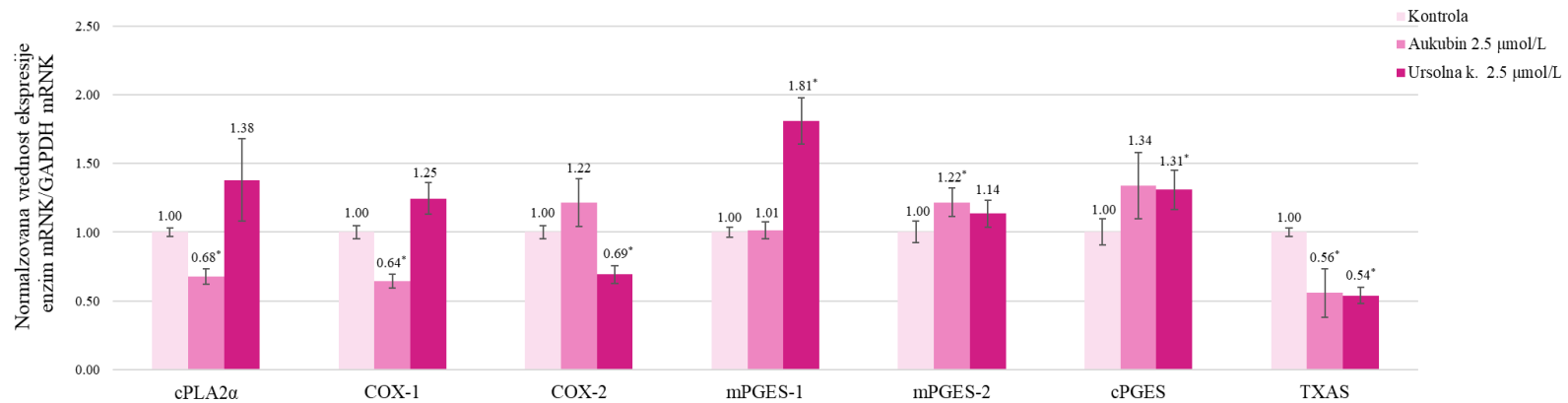
Floretin je jedno od malobrojnih jedinjenja analiziranih u ovom radu koje nije redukovalo ekspresiju COX-2. Međutim, s obzirom da je ovo jedinjenje ispitivano pri 2.5 nižoj koncentraciji u odnosu na ostale polifenole, postoji mogućnost da bi bilo aktivno pri koncentraciji pri kojoj su analizirana i druga jedinjenja.

Uticaj odabranih fenolnih kiselina na ekspresiju mRNA cPLA₂ α , COX-1 i COX-2, mPGES-1, mPGES-2, cPGES, TXAS prikazan je na *Histogramu 6.33.*, dok je na *Histogramu 6.34.* prikazan efekat dva jedinjenja karakteristična za bokvice, ursolne kiseline i aukubina.



Histogram 6.33. Uticaj* odabranih fenolnih kiselina na ekspresiju mRNA cPLA₂α, COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2, cPGES i TXAS u LPS-stimulisanim monocitima

*statistički značajno različito od kontrole(p ≤ 0.05)



Histogram 6.34. Uticaj* aukubina i ursolne kiseline na ekspresiju mRNA cPLA₂α, COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2, cPGES i TXAS u LPS-stimulisanim monocitima

*statistički značajno različito od kontrole(p ≤ 0.05)

Uz izuzetak ekspresije COX-1 mRNA koju su smanjile i galna i hlorogenska kiselina, uticaj hlorogenske kiseline, sa jedne strane, i kafene i galne kiseline, sa druge strane je bio obrnut u slučajevima ekspresije mRNA enzima uključenih u produkciju PGE₂ i TXA₂. Hlorogenska kiselina je povećala ekspresiju COX-2 i cPGES mRNA, a redukovala ekspresiju mPGES-1 i TXAS mRNA. Efekat koji su fenolne kiseline ispoljile na ekspresiju mRNA odabranih enzima cikooksigenaznog puta ne može da se poveže sa krajnjim uticajem na produkciju metabolita. Naime, hlorogenska kiselina je najviše smanjila produkciju PGE₂, iako je povisila ekspresiju COX-2 mRNA, a sa druge strane galna kiselina koja je 5.9 puta smanjila ekspresiju COX-2 mRNA, imala je neznatan uticaj na produkciju PGE₂. Nasuprot tome, galna kiselina je najviše redukovala produkciju TXA₂, iako je povećala ekspresiju terminalnog enzima uključenog u njegovu produkciju. U prethodnoj studiji pokazano je da kafena kiselina inhibira ekspresiju COX-2 bolje od hlorogenske kiseline (Kang i sar., 2009b), što je u skladu sa rezultatima prikazanim na *Histogramu 6.33*. Kao i u slučaju flavona, kod kojih je zabeleženo da glukuronidi imaju različitu aktivnost od aglikona kao polaznih jedinjenja, značajne razlike su uočene između aktivnosti hlorogenske kiseline i jednog od njenih metabolita koji mogu biti prisutni u krvi. Naime, nakon apsorpcije hlorogenske kiseline, u krvi su detektovane povećane koncentracije kafene kiseline. Navedeni rezultati svedoče da su neophodna detaljnija istraživanja aktivnosti formi u kojima su polifenolna jedinjenja prisutna u krvi.

Osim polifenolnih jedinjenja, analiziran je i potencijal iridoida, aukubuna, i triterpenske kiseline, ursolne kiseline, jedinjenja detektovanih u visokim koncentracijama u bokvicama. Aukubin je statistički značajno snizio ekspresiju cPLA₂ α , COX-1 i TXAS mRNA, što je verovatno doprinelo redukciji produkcije analiziranih metabolita, prvenstveno TXA₂. Ursolna kiselina, koja je dobar inhibitor aktivnosti COX enzima, značajno je supresovala ekspresiju COX-2 i TXAS mRNA. Takođe, kao što je i prethodno uočeno kod nekih jedinjenja koja su smanjila ekspresiju COX-2 mRNA, i ursolna kiselina je povećala ekspresiju mRNA drugog proinflatornog enzima, mPGES-1.

Ukoliko se uporede naši rezultati sa rezultatima prethodnog istraživanja (Hämäläinen i sar., 2011), uočava se sličnost u smislu da pojedina jedinjenja koja inhibiraju ekspresiju COX-2 mRNA povećavaju ekspresiju mPGES-1 mRNA. Takođe, ni u navedenom radu nije moguće utvrditi pravilnost između uticaja na ekspresiju mRNA COX-2 i mPGES-1: pet jedinjenja (flavon, pelargonidin, daidzein, genistein i genistin) je bar dvostruko jače redukovalo ekspresiju COX-2 nego PGES-1 mRNA, dva jedinjenja (izoramnetin i morin) su ispoljili skoro isti potencijal inhibicije ekspresije mRNA ovih enzima, kemferol je bolje inhibirao ekspresiju mPGES-1 (52.7%) nego COX-2 (33.1%) mRNA, a dva jedinjenja su inhibirala ekspresiju COX-2 mRNA, uz povećanje ekspresije mPGES-1 mRNA, dok je luteolin-7-*O*-glukozid delovao potpuno suprotno.

U radu Gabrielsen i saradnici (2010) je navedeno da medikamenti koji se koriste u terapiji ateroskleroze, kao što su na primer aspirin, statini ili klopidogrel ne utiču na ekspresiju TXAS mRNA u aterosklerotičnim plakovima, kao i da je ovo jedan od mehanizama terapije i prevencije ateroskleroze koji je delimično zanemaren. U tom smislu su zanimljivi rezultati koji prikazuju da neka jedinjenja prisutna u bokvicama u

visokim koncentracijama, kao što apigenin-7-*O*-glukozid, luteolin, aukubin, hlorogenska ili ursolna kiselina snižavaju ekspresiju mRNK ovog enzima. Iako su analizirane koncentracije jedinjenja znatno više od onih prisutnih u krvi, dalja istraživanja u ovom pravcu su neophodna kako bi se utvrdilo da li ova jedinjenja, ili eventualno proizvodi na bazi bokvica sa standardizovanim sadržajem ovih aktivnih komponenti, mogu da pomognu u prevenciji ateroskleroze.

Takođe, s obzirom da je povećana ekspresija TXAS detektovana i u ćelijama kancera (Cathcart i sar., 2011), zanimljivo bi bilo da se analizira da li inhibicija ekspresije TXAS doprinosi antikancerogenom delovanju navedenih jedinjenja.

U cilju bolje interpretacije rezultata, izračunati su *Pearsonovi* koeficijenti korelacije između uticaja odabranih jedinjenja na ekspresiju enzima i produkciju PGE₂ i TXA₂ u LPS-stimulisanim monocitima, a rezultati su prikazani u *Tabeli 6.21*. Takođe, rezultati su obrađeni i primenom analize glavnih komponenti, a ovi rezultati su prikazani na *Slici 6.8*.

Tabela 6.21. Pearsonovi koeficijenti korelacije između količina produkovanog PGE₂ i TXA₂ i ekspresije enzima uključenih u njihovu sintezu u LPS-stimulisanim monocitima

	PGE ₂ -s	TXA ₂ -s
	Pearsonovi koeficijenti r	
cPLA₂α	0.15	-0.16
COX-1	-0.12	-0.30
COX-2	-0.24	-0.18
mPGES-1	-0.21	-0.15
mPGES-2	-0.41	-0.24
cPGES	-0.21	-0.05
TXAS	0.48	0.73

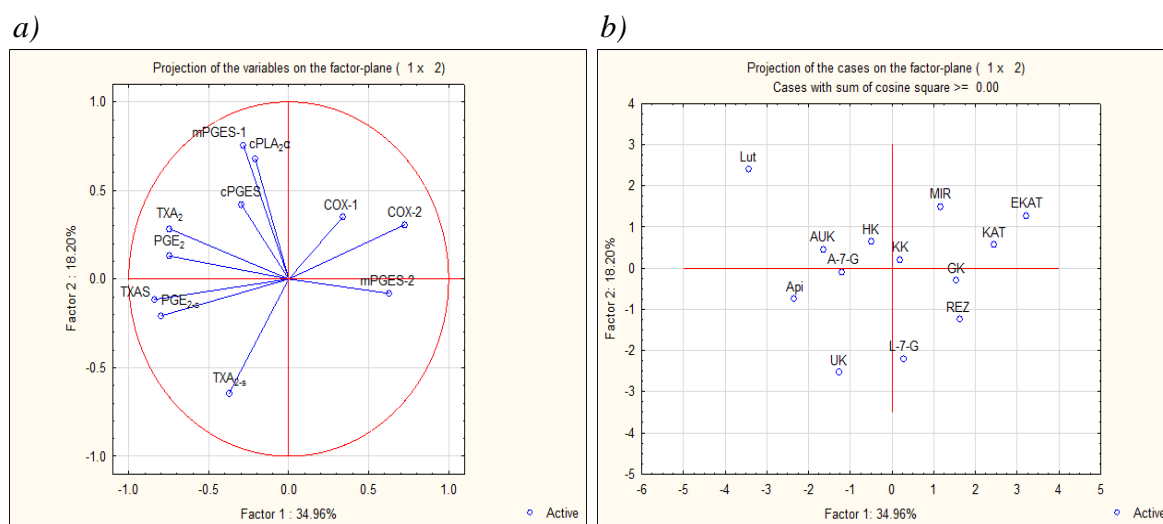
Oznake: cPLA₂α - uticaj na ekspresiju mRNK cPLA₂α u LPS-stimulisanim monocitima, COX-1 - uticaj na ekspresiju mRNK COX-1 u LPS-stimulisanim monocitima, COX-2- uticaj na ekspresiju mRNK COX-2 u LPS-stimulisanim monocitima, cPGES- uticaj na ekspresiju mRNK cPGES u LPS-stimulisanim monocitima, mPGES-1- uticaj na ekspresiju mRNK mPGES-1 u LPS-stimulisanim monocitima, mPGES-2- uticaj na ekspresiju mRNK mPGES-2 u LPS-stimulisanim monocitima, TXAS- uticaj na ekspresiju mRNK TXAS u LPS-stimulisanim monocitima; PGE₂-s i TXA₂-s - uticaj na količinu produkovanog PGE₂ i TXA₂ u LPS-stimulisanim monocitima

Zapaža se negativna korelacija između uticaja na ekspresiju mRNK oba COX enzima i sva tri PGES enzima i produkcije PGE₂ u LPS-stimulisanim monocitima. Vrednosti korelacionih faktora između produkcije PGE₂ i ekspresije COX-2, mPGES-1 i cPGES mRNK su niske, ali skoro identične. Jedino se uticaj između ekspresije mPGES-2 mRNK i produkcije PGE₂ može okarakterisati kao umerena negativna korelacija.

U pogledu uticaja na produkciju TXA₂, u oba sistema se zapaža slaba negativna korelacija između modulatornog efekta na ekspresiju mRNK ciklooksigenaza, i pozitivna korelacija između efekta na ekspresiju TXAS mRNK i produkciju TXA₂. Najveći korelacioni faktor (r=0.73), koji odgovara umerenoj direktnoj korelaciji, zapažen je između uticaja na ekspresiju TXAS mRNK i produkciju TXA₂ u stimulisanim monocitima. Ovako visok stepen korelacije je posledica delovanja epikatehina, miricetina, ursolne kiseline i aukubina, dok su neka druga jedinjenja, kao što su galna kiselina i rezveratrol, imali obrnuto proporcionalan odnos između efekta na ekspresiju TXAS i produkciju TXA₂. Na osnovu niskih vrednosti *Pearsonovih* koeficijenata između

dve ispitane aktivnosti, može da se pretpostavi da odabrana prirodna jedinjenja utiču na produkciju PGE₂ i TXA₂ delovanjem na nekoliko različitih nivoa, koji verovatno uključuju i ekspresiju mRNK enzima, ali i inhibiciju ekspresije enzima i same enzimske aktivnosti.

Od analiziranih 17 jedinjenja, primenom analize glavnih komponenti nisu obuhvaćeni apigenin-7-*O*-glukuronid i luteolin-7-*O*-glukuronid, čiji uticaj nije ispitan na produkciju metabolita u LPS-stimulisanim monocitima, kao ni floretin i pterostilben koji nisu ispitani u nestimulisanim monocitima. Rezultati analize glavnih komponenti prikazani su na Slici 6.8.



Slika 6.8. Analiza glavnih komponenti na osnovu ispoljene aktivnosti odabranih polifenolnih jedinjenja, ursolne kiseline i aukubina

a) doprinos varijabli na grafiku opterećenja (distribution of variables on loadings plot);

b) raspodela odabranih jedinjenja u zavisnosti od ispoljene aktivnosti

Skraćenice: (a) cPLA₂α - uticaj na ekspresiju mRNK cPLA₂α u LPS-stimulisanim monocitima, COX-1 - uticaj na ekspresiju mRNK COX-1 u LPS-stimulisanim monocitima, COX-2 - uticaj na ekspresiju mRNK COX-2 u LPS-stimulisanim monocitima, cPGES - uticaj na ekspresiju mRNK cPGES u LPS-stimulisanim monocitima, mPGES-1 - uticaj na ekspresiju mRNK mPGES-1 u LPS-stimulisanim monocitima, mPGES-2 - uticaj na ekspresiju mRNK mPGES-2 u LPS-stimulisanim monocitima, TXAS - uticaj na ekspresiju mRNK TXAS u LPS-stimulisanim monocitima; PGE₂ i TXA₂ - uticaj na količinu produkovanog PGE₂ i TXA₂ u nestimulisanim monocitima, PGE₂-s i TXA₂-s - uticaj na količinu produkovanog PGE₂ i TXA₂ u LPS-stimulisanim monocitima (b) A-7-G- apigenin-7-*O*-glukozid, API-apigenin, AUK-aukubin, EKAT-epikatehin, GK-galna kiselina, HK-hlorogenska kiselina, KAT-katehin, KK-kafena kiselina, L-7-G-luteolin-7-*O*-glukozid, LUT-luteolin, MIR-miricetin, REZ-rezveratrol, UK-ursolna kiselina.

Doprinos faktora 1 i 2 ukupnoj varijansi iznosi 53.16%, a na grafiku raspodele se može uočiti grupisanje jedinjenja iz iste klase. Na primer, flavan-3-oli su lokalizovani u gornjem desnom uglu (pozitivne vrednosti F1 i F2) verovatno zbog uticaja na ekspresiju COX-2 mRNK. Zanimljivo je da se ne uočava međusobno diferenciranje fenolnih kiselina, iako su ispoljile različite aktivnosti. Takođe, dok su apigenin i apigenin-7-*O*-glukozid relativno blizu pozicionirani, luteolin i luteolin-7-*O*-glukozid se nalaze na suprotnim stranama na grafiku raspodele. Pozicioniranje luteolina u deo koji odgovara negativnim vrednostima F1 i pozitivnim vrednostima F2, uslovljen je njegovim efektom na ekspresiju cPLA₂α i mPGES-1 mRNK, kao i na produkciju PGE₂ i TXA₂ u nestimulisanim monocitima.

U okviru ove doktorske diertacije je, prema nama dostupnim podacima, prvi put analiziran modulatorni efekat navedenih jedinjenja na ekspresiju svih enzima uključenih u produkciju PGE₂ i TXA₂.

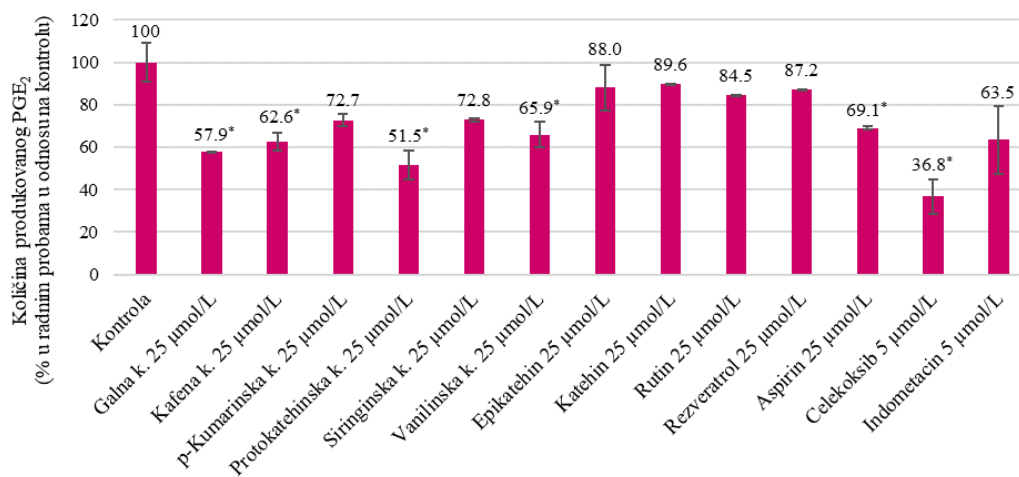
6.5.2. Uticaj odabranih polifenola na produkciju PGE₂ i TXA₂ u LPS-stimulisanim makrofagama

Uticaj 10 polifenolnih jedinjenja, prisutnih u *Merlot* vinima, na produkcije PGE₂ i TXA₂ analiziran je u U937 makrofagama u kojima je inflamacija izazvana dodatkom LPS-a.

Analiziran je uticaj šest fenolnih kiselina, četiri hidroksibenzoeve (galna, protokatehinska, siringinska i vanilinska) i dve hidroksicimentne kiseline (*p*-kumarinska i kafena), dva flavan-3-ola (epikatehin i katehin), jednog flavonola (rutin) i jednog stilbena (rezveratrol). Inicijalno, bilo je planirano da se ispita i biološka aktivnost kvercetina i miricetina, ali pošto su ova jedinjenja ispoljila citotoksično delovanje pri koncentraciji od 25 μmol/L, pri kojoj su analizirana druga polifenolna jedinjenja, njihova aktivnost nije ispitana. Efekat miricetina na produkciju PGE₂ i TXA₂ analiziran je u model sistemu sa U937 monocitima (*Poglavlje 6.5.1.*) pri koncentraciji od 2.5 μmol/L. Kvercetin je i pri ovako niskoj koncentraciji ispoljio citotoksično delovanje (*Poglavlje 6.2.*), te je isključen iz daljih eksperimenata.

Uparedo sa ispitivanjem biološkog potencijala polifenolnih jedinjenja, određena je aktivnost i tri standardna inhibitora ciklooksigenaza: aspirina, celekoksiba i indometacina. Aspirin je analiziran pri istoj koncentraciji kao i polifenolna jedinjenja, dok su celekoksib i indometacin analizirani pri pet puta nižoj koncentraciji. U primenjenom model sistemu, inhibicija produkcije PGE₂ može da se dovede u korelaciju sa inhibicijom ekspresije i aktivnosti COX-2 i mPGES-1, dok se inhibicija TXA₂ povezuje sa inhibicijom COX-1 i TXAS.

Preliminarni rezultati pokazuju da su u primenjenom model sistemu fenolne kiseline mnogo bolji inhibitori produkcije PGE₂ u odnosu na druge klase polifenolnih jedinjenja (*Histogram 6.35*). Naime, 4 od 6 analiziranih fenolnih kiselina su ispoljile inhibiciju produkcije PGE₂, dok delovanjem flavonoida i rezveratrola količina produkovanog PGE₂ nije bila statistički značajno smanjena u odnosu na kontrolu.



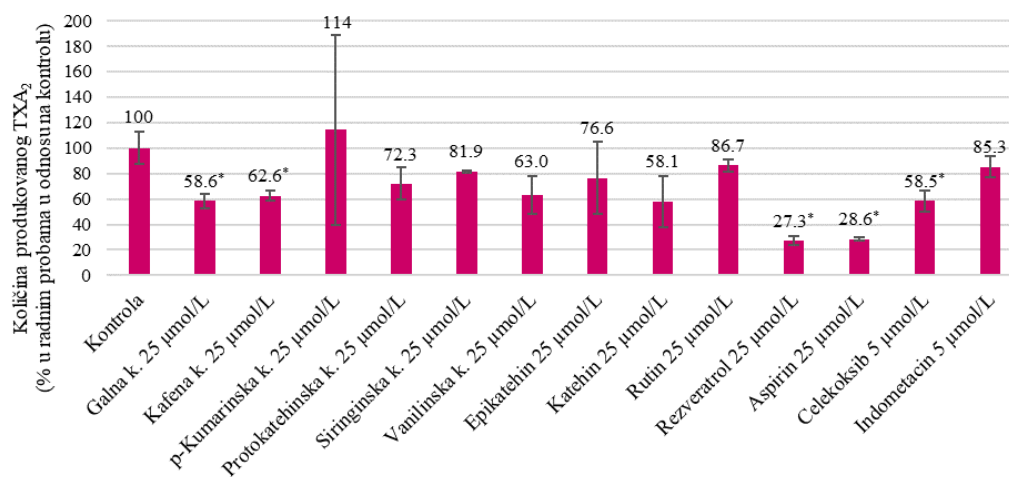
Histogram 6.35. Uticaj odabranih polifenolnih jedinjenja i standardnih COX inhibitora na produkciju PGE₂ u LPS-stimulisanim makrofagama*

* statistički značajno različito od kontrole ($p \leq 0.05$); § Količina produkovanog PGE₂ (%) predstavlja odnos površine pikova PGE₂ i internog standarda PGB₂ u radnim probama i površine pikova PGE₂ i PGB₂ u kontroli.

U grupi fenolnih kiselina, najbolju sposobnost inhibicije PGE₂ ispoljila je protokatehinska kiselina (48.5%), dok su *p*-kumarinska i siringinska imale najmanji uticaj na smanjenje produkcije PGE₂. Nije uočena razlika u ispitanoj aktivnosti između derivate hidroksibenzoeve i hidroksicimetne kiseline. Interesantno je da je protokatehinska kiselina bila aktivnija od aspirina pri istoj koncentraciji, dok su druge fenolne kiseline ispoljile približno isti nivo aktivnosti kao aspirin.

U odnosu na druge inhibitore ciklooksigenaza, sva polifenolna jedinjenja su bila manje aktivna. Naime, indometacin i celekoksib, iako analizirani pri petostruko nižoj koncentraciji, pokazala su približnu (indometacin) ili višu aktivnost (celekoksib). Celekoksib je selektivni inhibitor COX-2, pa ne iznenađuje da je upravo on najviše smanjio produkciju PGE₂, jer je poznato da PGE₂ produkovan tokom inflamacije prvenstveno potiče od COX-2.

Histogram 6.36. prikazuje uticaj odabranih polifenolnih jedinjenja na produkciju TXA₂.



Histogram 6.36. Uticaj polifenolnih jedinjenja i standardnih COX inhibitora na produkciju TXA₂ u LPS-stimulisanim makrofagama*

*statistički značajno različito od kontrole ($p \leq 0.05$); †Količina produkovanog TXA₂ (%) predstavlja odnos površine pikova TXA₂ i internog standarda PGB₂ u radnim probama i površine pikova TXA₂ i PGB₂ u kontroli.

Kao i u eksperimentima na monocitima, može se uočiti da polifenolna jedinjenja ispoljavaju različit nivo aktivnosti prilikom modulacije produkcije i PGE₂ i TXA₂. Naime, iako su sva ispitana polifenolna jedinjenja, izuzev *p*-kumarinske kiseline, inhibirala produkciju TXA₂, statistički značajan je bio efekat samo galne i kafene kiseline i rezveratrola.

Zanimljivo je da su sva tri navedena jedinjenja snažno inhibirala produkciju TXA₂ i u LPS-stimulisanim monocitima i u makrofagama, pri čemu su u LPS-stimulisanim monocitima povećala ekspresiju TXAS.

Posebno je zanimljiva aktivnost rezveratrola. Naime, rezveratrol, koji nije ispoljio statistički značajnu inhibiciju produkcije PGE₂, najviše supresuje produkciju TXA₂ u humanim makrofagama, ispoljavajući sličnu aktivnosti kao aspirin. Takođe, aktivnost koju je rezveratrol ispoljio na produkciju TXA₂ u LPS-stimulisanim monocitima bila je veoma slična aktivnosti aspirina. S obzirom da se kardioprotektivno delovanje aspirina zasniva na inhibiciji COX-1 i posredno inhibiciji produkcije TXA₂, moglo bi se pretpostaviti da rezveratrol deluje na sličan način. Međutim, usled različitog efekta aspirina i rezveratrola na produkciju PGE₂, postoje indicije da su za aktivnost rezveratrola zaslužni drugačiji mehanizmi, na primer inhibicija aktivnosti TXAS enzima. U nekoliko studija na izolovanim enzimima COX-1 i COX-2, rezveratrol je ispoljio bolju aktivnost pri inhibiciji COX-1 nego COX-2 (Takada i sar., 2004; Murias i sar., 2004; Kutil i sar., 2014). Sa druge strane, rezveratrol inhibira i neke od metaboličkih puteva kroz koje se indukuje ekspresija COX-2, uključujući i NF-κB signalnu kaskadu (Takada i sar., 2004), pa je moguće da je krajnji efekat njegove aktivnosti rezultat više načina delovanja na produkciju TXA₂.

S obzirom da su jedinjenja koja su eksperimentima na LPS-stimulisanim monocitima povećala produkciju TXA₂ delovala i na nivou ekspresije TXAS, moguće je da i *p*-kumarinska deluje sličnim mehanizmom. Nasuprot ovim rezultatima, rezultati

prethodnih ispitivanja pokazuju da *p*-kumarinska kiselina u *in vivo* i *in vitro* uslovima inhibira produkciju TXA₂ (Luceri i sar., 2007).

Iako su fenolne kiseline i aspirin ispoljile približnu aktivnost pri inhibiciji produkcije PGE₂, aspirin je bar dvostruko snažnije delovao na inhibiciju produkcije TXA₂ nego ispitane fenolne kiseline. Na osnovu ovih rezultata, uprkos strukturnoj sličnosti fenolnih, prvenstveno hidroksibenzoevih kiselina sa aspirinom, ipak može da se pretpostavi da imaju različit mehanizam delovanja.

Međutim, fenolne kiseline su ispoljile sličan potencijal inhibicije i PGE₂ i TXA₂, pa se može pretpostaviti da deluju u zajedničkim fazama sintetskih puteva PGE₂ i TXA₂. S obzirom da je korišćena egzogena arahidonska kiselina, prikazani rezultati ne mogu da reflektuju uticaj ovih jedinjenja na aktivnost fosfolipaza, te se može pretpostavi da deluju kao inhibitori COX-1/2. U velikom broju studija dokazan je inhibitorski efekat ovih kiselina i na aktivnost COX-1 i COX-2. Na primer, pokazano je da galna kiselina inhibira ekspresiju COX-2 u *in vitro* i *in vivo* uslovima delujući na NF-κB signalnu kaskadu (Hsiang i sar., 2013). Navedeni rezultati su u skladu sa rezultatima prikazanim na *Histogramu 6.33*. koji pokazuju da obe kiseline inhibiraju ekspresiju COX-2 mRNK u LPS-stimulisanim monocitima, dok galna kiselina redukuje i ekspresiju COX-1 mRNK.

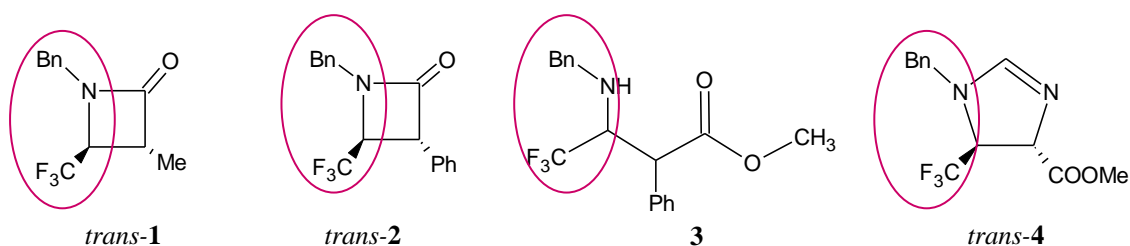
Epikatehin i katehin verovatno deluju na aktivnost ili ekspresiju COX-1 i TXAS mRNK, jer pri istim uslovima, više snižavaju nivo produkovanog TXA₂ nego PGE₂, ali ni jedan efekata koji su ispoljili u makrofagama nije statistički značajan. Uticaj epikatehina i katehina na produkciju TXA₂ potvrđen je i u prethodnim studijama gde su ispoljili dozno zavisni potencijal inhibicije produkcije TXA₂ (Vibes, 1994). Katehini iz zelenog čaja su među retkim polifenolnim jedinjenjima za koja je potvrđeno da utiču na aktivnost TXAS (Son i sar., 2004). Takođe, u istom radu je prikazano da katehini iz zelenog čaja inhibiraju oslobađanje arahidonske kiseline iz fosfolipidnog dvosloja, što bi se moglo protumačiti kao inhibicija aktivnosti fosfolipaze. U ovom radu katehin i epikatehin su ispoljili zanemarljiv uticaj na ekspresiju cPLA₂α mRNK, a oba jedinjenja su povećala ekspresiju TXAS, pri čemu je efekat epikatehina bio značajan. U sva tri model sistema, katehin je bio aktivniji kao inhibitor produkcije TXA₂, što se donekle može povezati i sa uticajem na ekspresiju TXAS mRNK.

Takođe, rutin je pokazao neznatan modulacioni efekat na produkciju PGE₂ i TXA₂, odnosno, nije bio aktivan. U eksperimentima na mišijim makrofagama, epikatehin i rutin su pokazali slabu inhibiciju produkcije PGE₂ (12.3 i 20.4%, redom, Hämäläinen i sar., 2011). Iako su navedenom radu korišćene četiri puta veće koncentracije od onih koje su korišćene u okviru ove disertacije, ispoljena aktivnost je slična. Osim na produkciju PGE₂, ispitan je uticaj rutina i na agregaciju trombocita i produkciju TXA₂. Rutin skoro da ne inhibira agregaciju trombocita, a u odnosu na kontrolu koja je predstavljala trombocite tretirane arahidonskom kiselinom, u uzorcima koji su sadržali i rutin zabeležena je veća koncentracija TXA₂. Sa druge strane, u trombocitima pretretiranim kolagenom rutin je smanjio produkciju TXA₂ (Guerrero i sar., 2005). U navedenim radovima je aglikon rutina, kvercetin, ispoljio bolji biološki potencijal, a Takano-Ishikawa i saradnici (2006) smatraju da jedan od potencijalnih razloga slabijeg delovanja rutina može da bude i smanjena permeabilnost glikozida kroz ćelijske membrane.

Uopšteno, na osnovu navedenih rezultata, može se pretpostaviti da analizirana polifenolna jedinjenja mogu da doprinose potencijalu vina da smanjuje produkciju PGE₂ i TXA₂. Produkciju PGE₂ najviše su redukovale fenolne kiseline, dok su rezveratrol, galna i kafena kiselina bili najbolji inhibitori produkcije TXA₂. Međutim, ne sme se zanemariti da je aktivnost kompleksnih smeša polifenolnih jedinjenja, kao što su vina, posledica sinergističkog delovanja velikog broja komponenti.

6.6. Upotreba optimizovane metode za ispitivanje anti-inflamatornog potencijala sintetskih jedinjenja

Jedan od ciljeva ove doktorske disertacije je bila i upotreba optimizovane metode za određivanje potencijala inhibicije produkcije PGE₂ i TXA₂ u U937 ćelijskoj liniji u ispitivanjima biološkog potencijala (novo)sintetisanih jedinjenja. Ova istraživanja su rađena u saradnji sa prof. dr Saso, dr Trulli, prof. dr Fioravanti i prof. dr Pellacani sa Univerziteta „La Sapienza“ iz Rima, čija istraživačka grupa je prethodno sintetisala nova jedinjenja (Trulli i sar., 2018a; Trulli i sar., 2018b) i ustupila ih za prikazane eksperimente. Ispitivana je inhibitorna aktivnost sledećih jedinjenja: 1-benzil-3-metil-4-(trifluorometil)azetid-2-on (*trans*-**1**; Trulli i sar., 2018a), 1-benzil-3-fenil-4-(trifluorometil)azetid-2-on (*trans*-**2**; Trulli i sar., 2018a), metil 3-(benzilamino)-4,4,4-trifluoro-2-fenilbutanoat (**3**; Dos Santos i sar., 2008) i metil *trans*-1-benzil-5-(trifluorometil)-4,5-dihidro-1*H*-imidazol-4-karboksilat (*trans*-**4**; Trulli i sar., 2018b). Zajednička strukturna karakteristika ovih jedinjenja je trifluorometil grupa vezana za alifatični ostatak: β-laktam (*trans*-**1** i *trans*-**2**), amino-estar (**3**) ili 2-imidazolinov prsten (*trans*-**4**; Slika 5.9.).



Slika 6.9. Strukture ispitivanih sintetskih jedinjenja

Smatra se da prisustvo fluorida doprinosi farmakološkim karakteristikama organskih jedinjenja, jer poboljšava njihovu metaboličku stabilnost i apsorpciju, a time i biološke funkcije. O značaju ovog supstituenta svedoči činjenica da oko 20% lekova koji se godišnje odobre za kliničku upotrebu sadrži atom fluora (O'Hagan, 2010).

Neka jedinjenja sa trifluorometil grupom su poznata kao dobri inhibitori enzima ciklooksigenaznog puta. Naime, nekoliko poznatih inhibitora PLA₂ sadrže upravo trifluorometilnu funkciju, na primer, arahidonil trifluorometil keton je prvi poznati inhibitor cPLA₂α koji je imao veoma važnu ulogu u otkrivanju funkcije ovog enzima. β-tio-trifluorometil keton (C₈H₁₇SCH₂COCF₃) je jedan od najpotentnijih inhibitora iPLA₂β, dok darapladib, prvi inhibitora LpPLA₂ koji je ušao u klinička ispitivanja, takođe sadrži trifluorometilnu funkciju (Kokotou i sar., 2017; Nikolau i sar., 2019).

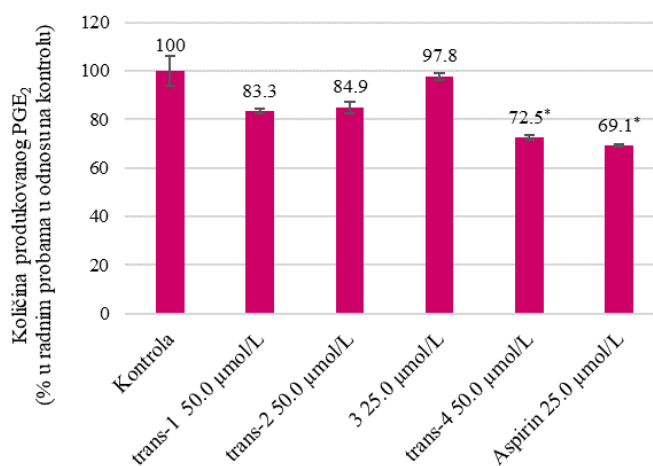
Takođe, trifluorometil grupu, vezanu za pirazolov prsten supstituisan i sa dva aromatična prstena, sadrže i neki od najpoznatijih inhibitora ciklooksigenaza, SC-560 (selektivni inhibitor COX-1, Pannunzio i Coluccia, 2018) i celekoksib (selektivni inhibitor COX-2, O'Hagan, 2010). Osim toga, pokazno je da supstitucija 2' metil grupe indometacina sa trifluorometil grupom povećava selektivnost ka inhibiciji COX-2 (Blobaum i sar., 2013). Xie i saradnici (2017) su utvrdili da trifluorometilovani aromatični derivati 4-piperidinona mogu da inhibiraju produkciju proinflamatornih

medijatora TNF α , IL-1 β , PGE $_2$ i NO u LPS-stimulisanim mišijim makrofagama (RAW 264.7), kao i da ispoljavaju anti-inflamatorno delovanje i u *in vivo* uslovima.

U okviru ove doktorske disertacije je prvi put ispitana sposobnost navedenih jedinjenja da inhibiraju produkciju PGE $_2$ i TXA $_2$ u LPS-stimulisanim U937 makrofagama. Takođe, korišćenjem istog model sistema ispitan je uticaj na ekspresiju mRNK COX-1, COX-2 i cPLA 2α po procedurama opisanim u *Poglavlju 5.4.5*. Dobijeni rezultati su objavljeni u radu Beara i saradnici iz 2020. godine.

Nakon preliminarnih testova citotoksičnosti, odabrane su netoksične koncentracije koje su korišćene za određivanje anti-inflamatornog potencijala (*Histogram 6.11.*). Jedinjenja sa trifluorometil grupom vezanom direktno za ciklični prsten su ispoljila manju toksičnost i ispitivana su pri koncentraciji od 50 $\mu\text{mol/L}$. Jedinjenje **3** je pri ovoj koncentraciji bilo toksično prema 15% ćelija, pa je u anti-inflamatornim testovima korišćeno pri koncentraciji od 25 $\mu\text{mol/L}$. Aspirin, pri koncentraciji od 25 $\mu\text{mol/L}$, je služio kao standardno jedinjenje. Indometacin i celekoksib su pri znatno nižim koncentracijama bili netoksični za ćelije, i stoga nisu korišćeni kao referentna jedinjenja.

Kao što je ranije navedeno, PGE $_2$ je jedan od glavnih proinflamatornih medijatora koji nastaje ciklooksigenaznim putem metabolizma arahidonske kiseline i koji je odgovoran za klasične znakove upale: crvenilo, otok i bol. Smatra se da u LPS-stimulisanim makrofagama produkovani PGE $_2$ nastaje prvenstveno delovanjem COX-2 (*Poglavlje 6.1.*). Na *Histogramu 6.37.* su prikazani rezultati ispitivanja uticaja analiziranih jedinjenja na produkciju PGE $_2$.



Histogram 6.37. Uticaj sintetskih jedinjenja (trans-1, trans-2, 3 i trans-4) i aspirina na produkciju PGE $_2$ [§] u LPS-stimulisanim makrofagama*

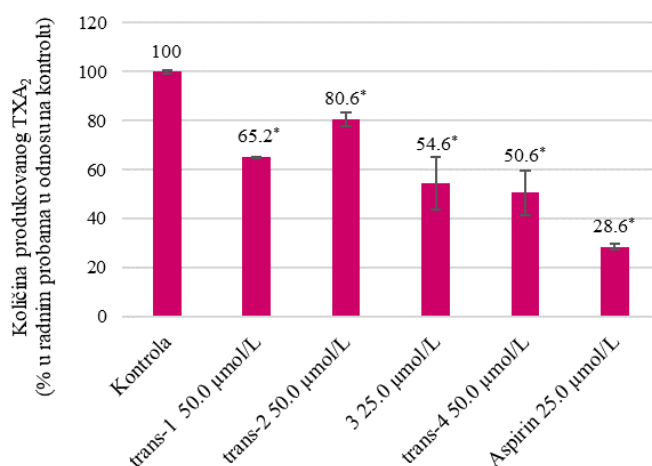
* statistički značajno različito od kontrole ($p \leq 0.05$); [§]Količina produkovanog PGE $_2$ (%) predstavlja odnos površine pikova PGE $_2$ i internog standarda PGB $_2$ u radnim probama i površine pikova PGE $_2$ i PGB $_2$ u kontroli

Na osnovu priloženog *Histograma 6.37.* može se uočiti da sva analizirana jedinjenja ispoljavaju slabiju aktivnost u odnosu na aspirin. Naime, jedino je jedinjenje *trans-4* ispoljilo statistički značajnu inhibiciju produkcije PGE $_2$. S obzirom da jedino jedinjenje *trans-4* sadrži imidazolinov prsten, moguće je da upravo ova strukturna karakteristika doprinosi utvrđenom inhibitornom potencijalu. Naime, rezultati prethodnih studija

sugerišu da 2-imidazolin može da bude zanimljivo polazno jedinjenje za sintezu selektivnih inhibitora COX-2, pri čemu su ispitivana jedinjenja koja za imidazolinov prsten imaju vezana dva aromatična prstena, jedan sa sulfonamidnim ili metilsulfonil grupama, a drugi sa bromidnim, hloridnim, fluoridnim ili trifluorometil grupama (Sarnpitak i sar., 2014). Rezultata prikazani na *Histogramu 6.37.* ukazuju da bi i derivati 2-imidazolina koji imaju trifluorometilnu grupu vezanu direktno za prsten mogli da budu potencijalni inhibitori ciklooksigenaza. Međutim, da bi se ova hipoteza ispitala, neophodne su studije molekuskog modelovanja pomoću kojih bi se utvrdilo da li i preko kojih funkcija se dato jedinjenje vezuje u aktivni centar enzima uključenih u produkciju PGE₂.

Iako su derivati β-laktama najpoznatiji po svom antibiotskom delovanju, u radu Arefi i saradnika (2020) je pokazano da mogu da budu i polazno jedinjenje za sintezu COX-2 selektivnih inhibitora. Na osnovu rezultata prikazanih na *Histogramu 6.37.* jedinjenja koja sadrže β-laktamski prsten nisu ispoljila sposobnost inhibicije produkcije PGE₂, odnosno inhibicije COX-2. Potencijalno objašnjenje može da bude razlika u supstituentima prisutnim na β-laktamskom prstenu. Naime, Arefi i saradnici (2020) nisu koristili trifluorometil derivate, već metilsulfonil derivate. Rezultati molekuskog modelovanja su pokazali da se upravo ova grupa veže u dodatni hidrofobni džep COX-2, koji stvaraju aminokiseline Arg513, Phe518 i Val523.

TXA₂ je vazokonstriktor i faktor agregacije trombocita, čiji inhibitori imaju potencijalnu primenu u tretmanu kardiovaskularnih bolesti i kancera. Sva ispitana jedinjenja su ispoljila statistički značajnu sposobnost inhibicije ovog lipidnog medijatora (*Histogram 6.38.*).



Histogram 6.38. Uticaj sintetskih jedinjenja (trans-1, trans-2, 3 i trans-4) i aspirina na produkciju TXA₂§ u LPS-stimulisanim makrofagama*

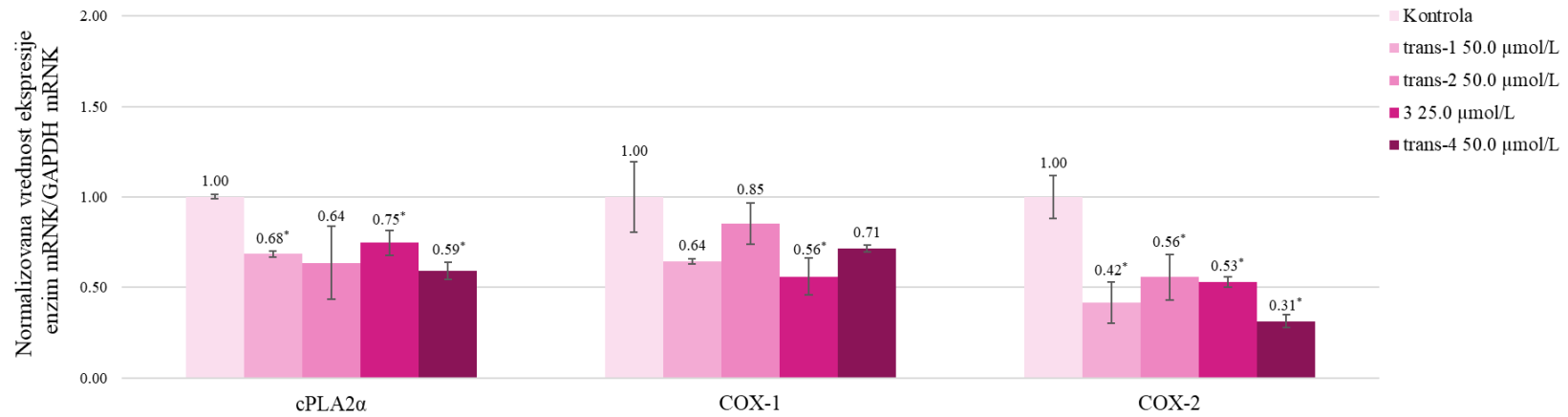
* statistički značajno različito od kontrole ($p \leq 0.05$); § Količina produkovanog TXA₂ (%) predstavlja odnos površine pikova TXA₂ i internog standarda PGB₂ u radnim probama i površine pikova TXA₂ i PGB₂ u kontroli

Sposobnost novoispitanih jedinjenja za inhibiciju TXA₂ se kreće u opsegu od 19.4 (*trans-2*) do 49.6% (*trans-4*), što je slabija aktivnost u odnosu na onu koju je ispoljio aspirin pri dvostruko nižoj koncentraciji (68.8%). Kao i u slučaju inhibicije produkcije

PGE₂, jedinjenje *trans-4* je ispoljilo najbolju aktivnost. Međutim, s obzirom da je jedinjenje **3** analizirano pri dvostruko nižoj koncentraciji u odnosu na jedinjenje **4**, a ispoljilo je neznatno slabiji efekat, može se smatrati dobrim inhibitorom produkcije TXA₂. Znatno bolji potencijal svih jedinjenja da inhibiraju produkciju TXA₂ nego PGE₂, upućuje na mogućnost da zajednička strukturna karakteristika ovih jedinjenja (označena ljubičastom bojom na *Slici 5.9.*) potencijalno doprinosi inhibiciji TXAS.

Osim kao inhibitori enzimske aktivnosti, potencijalno anti-inflamatorno delovanje ova jedinjenja mogu da ispoljavaju na nivou ekspresije gena enzima uključenih u ciklooksigenazni put. Stoga je ispitan uticaj na ekspresiju mRNK enzima prve faze sinteze, odnosno onih enzima koji su uključeni u produkciju oba metabolita (COX-1, COX-2 i cPLA₂α), a rezultati su prikazani na *Histogramu 6.39.*

Kao što je prikazano u *Poglavlju 6.1.* tretman LPS povećava ekspresiju COX-2 i cPLA₂α mRNK, a blago smanjuje ekspresiju COX-1 mRNK. Analizirana jedinjenja su delovala na ekspresiju mRNK sva tri navedena enzima, pri čemu je relativni potencijal ispoljene inhibicije jedinjenja *trans-1*, *trans-2* i *trans-4* bio isti, odnosno, ekspresija COX-2 mRNK je najjače, a ekspresija COX-1 mRNK najslabije modifikovana. Jedinjenje **3** je ispoljilo najsnažniju inhibiciju ekspresije COX-1 mRNK, približnog nivoa kao i ekspresiju COX-2 mRNK, ali slabiju od inhibicije ekspresije cPLA₂α mRNK.



Histogram 6.39. Uticaj sintetskih jedinjenja (trans-1, trans-2, 3 i trans-4) na ekspresiju COX-1, COX-2 i cPLA2α mRNK u LPS-stimulisanim makrofagama*

* statistički značajno različito od kontrole ($p \leq 0.05$);

U pogledu inhibicije ekspresije cPLA₂α mRNA, enzima koji učestvuje u oslobađanju arahidonske kiseline iz fosfolipidnog dvosloja, uočava se da je jedinjenje *trans-4* ispoljilo najbolji potencijal. Sposobnost modulacije ekspresije cPLA₂α mRNA, pokazuje da bi navedena jedinjenja mogla da utiču i na lipooksigenazni put metabolizma arahidonske kiseline.

Iako je COX-1 dugo smatrana izoformom COX koja je zadužena za produkciju prostanoida tokom homeostaze, rezultati novijih ispitivanja svedoče da je njena ekspresija povećana u nekim tumorima. Takođe, utvrđeno je i da TXA₂ može da pospešuje angiogenezu, metastazu, proliferaciju i invaziju tumora. Na osnovu rezultata prikazanih na *Histogramima* 6.38. i 6.39., može da se pretpostavi da bi ispitana jedinjenja koja supresiju ekspresiju COX-1 mRNA i produkciju TXA₂, odnosno jedinjenje **3**, mogla da budu potencijalno dobri antikancerogeni agensi. Upravo je jedinjenje **3** ispoljilo najveću citotoksičnost prema U937 ćelijskoj liniji, koja predstavlja ćelijsku liniju humane mijeloidne leukemije. Kako bi se utvrdio potencijalni antikancerogeni potencijal jedinjenja **3**, neophodno je dalje ispitivanje korišćenjem većeg broja kancerogenih ćelijskih linija, prvenstveno ćelijskih linija kancera ovarijuma, jer je u njima ekspresija COX-1 izrazito povišena (Gupta i sar., 2003; Daikoku i sar., 2005; Sugimoto i sar., 2007).

Zanimljivo je da su sva jedinjenja ispoljila značajnu sposobnost inhibicije ekspresije COX-2 i cPLA₂α mRNA, što ne bi moglo da se pretpostavi na osnovu krajnjeg efekta, tj. nastale količine PGE₂ u slučaju tretmana jedinjenjima *trans-1*, *trans-2* i **3**. Međutim, kao što je pokazano u prethodnom poglavlju, neka jedinjenja koja snižavaju ekspresiju COX-2 mRNA mogu da povećavaju mRNA ekspresiju terminalnih enzima uključenih u produkciju PGE₂, pa potencijalno objašnjenje može biti da je povećana ekspresija mRNA ili aktivnost PGES (posebno inducibilne mPGES-1) i na taj način kompenzovana smanjena ekspresija COX-2 mRNA, što rezultuje nesmanjenom produkcijom PGE₂.

Uopšteno, najbolju sposobnost inhibicije mRNA enzima čija je ekspresija znatno povećana u inflamaciji (COX-2 i cPLA₂α) ispoljilo je jedinjenje *trans-4*. Ovo jedinjenje je u svim testovima, i na nivou ekspresije i na nivou produkcije PGE₂ i TXA₂, ispoljilo dobru aktivnost, i izdvojilo se kao potencijalni anti-inflamatorni agens. Rezultati ranijih istraživanja pokazuju da jedinjenja koja sadrže imidazolinov prsten ispoljavaju anti-inflamatorno delovanje, odnosno inhibiciju produkcije TNFα i IL-6, tako što deluju na NF-κB signalnu kaskadu (Kahlon i sar., 2009). S obzirom da je upravo ova kaskada jedan od signalnih puteva koji se aktivira nakon stimulacije makrofaga sa LPS (*Poglavlje* 5.5.5.), moguće je da i jedinjenje *trans-4* deluje upravo na ovaj signalni put.

Neophodna su dalja istraživanja kako bi se utvrdio tačan mehanizam delovanja i efikasnost ovog jedinjenja *in vivo*, ali na osnovu ovde prikazanih rezultata postoje indicije da bi jedinjenja strukturno slična jedinjenju *trans-4*, odnosno trifluorometilovani imidazolini mogli da budu polazna jedinjenja za razvoj novih anti-inflamatornih lekova koja bi inhibirala i ekspresiju i aktivnost proinflamatornih enzima.

7. Zaključak

Inflamacija (upala, zapaljenje) je imunološki proces koji predstavlja odbrambeni odgovor organizma na povredu tkiva izazvanu hemijskim, mikrobiološkim ili fizičkim agensima. Primarni cilj inflamatornog odgovora (akutna inflamacija) je uklanjanje proinflamatornog stimulusa i reparacija tkiva. Međutim, ako je mehanizam regulacije ovog procesa narušen, inflamacija postaje hronična. Hronični inflamatorni procesi imaju značajnu ulogu u patogenezi ateroskleroze, artritisa, dijabetesa, kancera, autoimunih i neurodegenerativnih oboljenja (Stables i Gilroy, 2011; Koeberle i Werz, 2018). Jedan od najpoznatijih i najtraženijih lekova na svetu je aspirin, koji pripada grupi nesteroidnih anti-inflamatornih lekova i deluje kao inhibitor ciklooksigenaza, ključnih enzima u procesu metabolizma arahidonske kiseline.

Arahidonska kiselina (5,8,11,14-eikozatetraenska kiselina) je polinezasićena masna kiselina koja se pod dejstvom različitih stimulusa oslobađa iz fosfolipidnog dvosloja ćelijskih membrana, a nakon toga se, u jednom od tri metabolička puta (epoksigenazni, ciklooksigenazni ili lipooksigenazni), transformiše do velikog broja signalnih lipidnih molekula - eikozanoida. Eikozanoidi imaju važnu ulogu u fiziološkim, ali i u patofiziološkim procesima, a naročito u inflamaciji (Curtis-Prior, 2004). U fokusu naših istraživanja bili su eikozanoidi prostaglandin E₂ (PGE₂) i tromboksan A₂ (TXA₂), jedni od najvažnijih proizvoda ciklooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline.

PGE₂ je neophodan za pravilno funkcionisanje bubrega, reproduktivnog i gastrointestinalnog sistema. Nasuprot tome, PGE₂ je i jedan od najpoznatijih proinflamatornih medijatora koji je odgovoran za klasične znakove upale: otok, bol, crvenilo, dok povećana produkcija PGE₂ doprinosi razvoju kancera, artritisa i kardiovaskularnih bolesti (Legler i sar., 2010; Ricciotti i FitzGerald, 2011). TXA₂ je faktor agregacije trombocita, vazokonstriktor i bronhokonstriktor koji je neophodan za održavanje homeostaze prvenstveno kardiovaskularnog sistema. Sa druge strane, usled narušenih regulatornih mehanizama, može doći do razvoja patoloških stanja (tromboza, ateroskleroza, preeklampsija, gestacijska i plućna hipertenzija, razvoj i progresija kancera) u kojima učestvuju i TXA₂ (Dogne i sar., 2006).

Na tržištu je prisutan veliki broj lekova koji se koriste u tretmanu inflamatornih oboljenja. Zbog nedovoljne efikasnosti i/ili kontraindikacija koje se javljaju usled duže upotrebe ovih lekova, intenzivno se traga za novim agensima koji bi mogli da supresuju inflamaciju, a time i razvoj mnogih bolesti. Imajući u vidu važnost regulacije produkcije PGE₂ i TXA₂ u inflamatornim procesima i neophodnost pronalaženja novih, bezbednih anti-inflamatornih agenasa, kao što su na primer biološki aktivni prirodni proizvodi, u ovoj disertaciji je ispitivan potencijal sekundarnih metabolita biljaka - polifenolnih jedinjenja da inhibiraju produkciju PGE₂ i TXA₂ u *in vitro* procesima inflamacije.

Pored odabranih standardnih polifenola, u prikazanim istraživanjima su kao bogati izvori ovih prirodnih proizvoda korišćeni ekstrakti bokvica i uzorci vina, koji su poznati po blagotvornom delovanju na organizam i koji imaju dugu tradiciju upotrebe u ishrani i etnomedicini (WHO 1999; Guilford i Pezzuto, 2011; Gonçalves i Romano, 2016; Pavlidou i sar., 2018; Ji i sar., 2019; Fragopoulou i Antonopoulou, 2020). HPLC-MS/MS tehnika je korišćena za praćenje uticaja ispitivanih uzoraka na nivo produkcije PGE₂ i TXA₂ u procesu inflamacije u *in vitro* model sistemu, koji je sadržao važne komponente imunog sistema - monocite ili makrofage (U937 ćelijska linija) stimulisane LPS-om. U

cilju proučavanja mehanizma delovanja, primenom RT-qPCR metode praćen je uticaj ispitivanih uzoraka na ekspresiju mRNK enzima uključenih u deo ciklooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline koji rezultuje sintezom PGE₂ i TXA₂, i obuhvata enzime prve faze: PLA₂ (fosfolipaza A₂) i COX-1/2 (ciklooksigenaza-1 i -2), kao i enzime terminalnih faza: tri PGES (prostaglandin E sintaza) i TXAS (tromboksan A sintaza).

Eksperimentalni deo istraživanja obuhvatao je:

1. Optimizaciju *in vitro* model sistema
Određivanje optimalnih eksperimentalnih uslova za produkciju PGE₂ i TXA₂ u LPS-stimulisanim U937 monocitima i makrofagama;
2. Ispitivanje citotoksičnosti standardnih jedinjenja, ekstrakata bokvica i uzoraka vina
Odabir subtoksičnih koncentracija standardnih jedinjenja (7 fenolnih kiselina, 9 flavonoida, 2 metabolita flavonoida, 2 stilbena, 1 dihidrohalkon, 1 iridoid, 1 triterpenska kiselina, 4 sintetska jedinjenja, 4 standardna inhibitora COX-1/2 enzima), 6 vodenih i 6 metanolnih ekstrakata bokvica, 17 uzoraka *Merlot* vina;
3. Pripremu i hemijsku karakterizaciju ispitivanih uzoraka
Analiza sastava vodenih i metanolnih ekstrakata šest vrsta bokvica (*P. altissima* L., *P. argentea* Chaix 1785, *P. holsteum* Scop., *P. lanceolata* L. 1753, *P. major* L. 1753, *P. media* L. 1753) i 17 uzoraka *Merlot* vina (12 vina iz Srbije i 5 iz Francuske, Italije, Makedonije, Slovenije i Španije) primenom hromatografskih (HPLC-MS/MS, HPLC-UV/VIS, HPLC-DAD) i spektrofotometrijskih metoda (UV/VIS);
4. Određivanje uticaja ekstrakata bokvica na produkciju PGE₂ i TXA₂
Praćenje uticaja metanolnih i vodenih ekstrakata šest vrsta bokvica na:
 - produkciju PGE₂ i TXA₂ u nestimulisanim i LPS-stimulisanim monocitima,
 - ekspresiju cPLA₂ α , COX-1/2, mPGES-1/2, cPGES i TXAS mRNA u LPS-stimulisanim monocitima,
 - produkciju PGE₂ i TXA₂ u LPS-stimulisanim makrofagama;
5. Određivanje uticaja *Merlot* vina na produkciju PGE₂ i TXA₂
Praćenje uticaja uzoraka *Merlot* vina na:
 - produkciju PGE₂ i TXA₂ u LPS-stimulisanim makrofagama,
 - ekspresiju cPLA₂ α , COX-1/2, mPGES-1/2, cPGES i TXAS mRNA u LPS-stimulisanim makrofagama;
6. Određivanje uticaja odabranih standardnih jedinjenja na produkciju PGE₂ i TXA₂
Praćenje uticaja standardnih jedinjenja, prvenstveno polifenola (3 fenolne kiseline, 7 flavonoida, 2 metabolita flavonoida, 2 stilbena, 1 dihidrohalkon, 1 iridoid, 1 triterpenska kiselina) na:
 - produkciju PGE₂ i TXA₂ u nestimulisanim i LPS-stimulisanim monocitima,
 - ekspresiju cPLA₂ α , COX-1/2, mPGES-1/2, cPGES i TXAS mRNA u LPS-stimulisanim monocitima;Praćenje uticaja standardnih polifenolnih jedinjenja karakterističnih za vina (6 fenolnih kiselina, 3 flavonoida, 1 stilbena) na:
 - produkciju PGE₂ i TXA₂ u LPS-stimulisanim makrofagama;
7. Primenu optimizovanog model sistema za ispitivanje anti-inflamatornog potencijala sintetskih jedinjenja

Praćenje uticaja četiri sintetska trifluorometil derivata na:

- produkciju PGE₂ i TXA₂ u LPS-stimulisanim makrofagama,
- ekspresiju cPLA₂ α i COX-1/2 mRNA u LPS-stimulisanim makrofagama.

U937 ćelijska linija je veoma često korišćena za proučavanje metabolizma arahidonske kiseline (Sanduja i sar., 1991; Wong i sar., 1997; Penglis i sar., 2000; Rioux i Castonguay, 2000; Jiang i sar., 2003a; Jiang i sar., 2003b). Međutim, primenjeni eksperimentalni uslovi se razlikuju po korišćenim stimulusima, vremenu inkubacije i metodama praćenja produkcije različitih proizvoda. U cilju odabira optimalnih uslova za praćenje uticaja na nivo produkcije PGE₂ i TXA₂, kao i ekspresiju mRNA enzima uključenih u deo ciklooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline koji rezultuje sintezom PGE₂ i TXA₂ u U937 monocitima i makrofagama, ispitan je veći broj eksperimentalnih uslova u kojima su varirani broj ćelija, stimulusi (kalcimicin i CaCl₂, arahidonska kiselina, LPS, PMA), količina i vrsta supstrata (endogena ili egzogena arahidonska kiselina), kao i vremena inkubacije. Urađena je i optimizacija uslova transformacije U937 monocita u makrofage. Optimizovane procedure su korišćene u eksperimentima, a mogu biti podeljene u tri grupe:

- a) Model sistem sa nestimulisanim monocitima - praćenje uticaja ispitivanih uzoraka na produkciju PGE₂ i TXA₂ tokom homeostaze, aktivna samo COX-1,
- b) Model sistem sa LPS-stimulisanim monocitima - praćenje uticaja ispitivanih uzoraka na produkciju PGE₂ i TXA₂ tokom rane faze inflamatornog odgovora, aktivne i COX-1 i COX-2,
- c) Model sistem sa LPS-stimulisanim makrofagama - praćenje uticaja ispitivanih uzoraka na produkciju PGE₂ i TXA₂ tokom kasnijih faza inflamatornog odgovora, dominantno aktivna COX-2.

Radne koncentracije ekstrakata bokvica su bile 500 μ g/mL, uzoraka *Merlot* vina 150 μ g/mL, 2.5 μ mol/L je bila koncentracija odabranih standardnih prirodnih jedinjenja i standardni COX-inhibitori (aspirin, celekoksib, indometacin SC-560), a u nekim model sistemima, aktivnost jedinjenja koja nisu ispoljila toksično delovanje ispitana je i pri koncentraciji od 25 μ mol/L. Odabrane radne koncentracije sintetskih jedinjenja su bile: 50 μ mol/L za *trans-1*, *trans-2* i *trans-4*, a 25 μ mol/L za jedinjenje **3**.

Rezultati spektrofotometrijske (UV/VIS) analize ekstrakata bokvica (*oznake vodenih i metanolnih ekstrakata*: *P. altissima* L. - PALV i PALM; *P. argentea* Chaix 1785 - PARV i PARM; *P. holosteum* Scop. - PHOV i PHOM; *P. lanceolata* L. 1753 - PLAV i PLAM; *P. major* L. 1753 - PMAV i PMAM; *P. media* L. 1753 - PMEV i PMEM) pokazuju da je najveći sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja, flavonoida i tanina prisutan u vrsti *P. holosteum*, a najniži u vrsti *P. lanceolata*. Primenom HPLC-MS/MS i HPLC-DAD tehnike, od analiziranih 50 jedinjenja, detektovano je 28 (9 fenolnih kiselina, 11 flavonoida, 3 kumarina, 1 karboksilna i 1 triterpenska kiselina, 1 feniletanoidni glikozid, 2 iridoida). Feniletanoidni glikozid, akteozid, predstavljao je dominantno jedinjenje u svim vrstama (od 34.2 mg/g s.e. u PARV do 189 mg/g s.e. u PHOM). Najzastupljenije fenolne kiseline bile su hlorogenska (od 1.55 μ g/g s.e. u PMAV do 566 μ g/g s.e. u PHOM) i vanilinska kiselina (od 32.3 μ g/g s.e. PMAV do 164 μ g/g s.e. u PALV). Najviše detektovanih flavonoida u bokvicama pripada klasi flavona (apigenin, luteolin, njihovi glikozidi, i krizoeriol). Od iridoidnih glikozida, koji su

hemotaksonomski markeri roda *Plantago*, aukubin je potvrđen u svim ekstraktima, a najveće koncentracije sadržali su PMEM (44.3 mg/g s.e.) i PARM (39.9 mg/g s.e.). Katalpol je bio prisutan samo u vodenim i metanolnim ekstraktima vrsta *P. altissima*, *P. argentea* i *P. lanceolata*. Određene su i visoke koncentracije ursolne kiseline, posebno u slabo ispitanim vrstama *P. argentea* (1210 µg/g s.e.) i *P. media* (711 µg/g s.e.).

Uopšteno, iako postoje i kvantitativne i kvalitativne razlike u sastavu ekstrakata, na osnovu varijacije hemijskog sastava (PCA), može se uočiti da su analizirani ekstrakti u načelu grupisani po vrstama bokvica. Ipak, kao posebno interesantni mogu se izdvojiti rezultati analize hemijskog sastava vodenih ekstrakata (infuza, čajeva) koje odlikuje izuzetno raznovrstan i bogat hemijski sastav. Mnoga od detektovanih jedinjenja, kao što su na primer aukubin, akteozid, hlorogenska kiselina, apigenin i luteolin su poznata po dobroj biološkoj aktivnosti i blagotvornom dejstvu na zdravlje. Prikazani rezultati sugerišu na potrebu za daljim ispitivanjima biološkog potencijala u cilju otkrivanja mehanizama kojim ove vrste mogu da deluju, ali i detaljne karakterizacije hemijskog sastava u cilju dobijanja standardizovanih preparata.

Ekstrakti bokvica su ispoljili umereni modulatorni efekat na produkciju PGE₂ i TXA₂ u ispitivanim sistemima. Produkciju PGE₂ tokom homeostaze (nestimulisanim monocitima) najviše su inhibirali PHOV i PMEM (47.6 i 45.1%, redom), a u monocitima u kojima je inflamacija izazvana dodatkom LPS najaktivniji je bio PALM (36.5%). PMAM je najviše inhibirao produkciju TXA₂ kako u nestimulisanim monocitima (29.6%), tako i u LPS-stimulisanim monocitima (62.7%). Međutim, ovaj ekstrakt nije značajno uticao na produkciju TXA₂ u LPS-stimulisanim makrofagama. Ekstrakti vrsta *P. altissima*, *P. lanceolata* i *P. media* su najsnažnije redukovali ekspresiju COX-2 mRNK u monocitima u kojima je izazvana inflamacija. Najbolju aktivnost su ispoljili ekstrakti vrste *P. altissima* koji su 8.3 puta (PALM), odnosno 9.1 puta (PALV) snizili ekspresiju COX-2 mRNK. Iako je bilo očekivano da ekstrakti koji su redukovali ekspresiju COX-2 mRNK smanjuju i ekspresiju mRNK mPGES-1, drugog proinflatarnog enzima, nije zabeležen navedeni efekat. Na primer, PALM i PMEM, ekstrakti koji su snažno supresovali ekspresiju COX-2 mRNK, povećali su ekspresiju mRNK mPGES-1, a snizili ekspresiju mRNK drugih enzima uključenih u produkciju PGE₂: mPGES-2 i cPGES. Sa druge strane, vodeni ekstrakti su dodatno indukovali ekspresiju svih terminalnih enzima uključenih u produkciju PGE₂, a intenzitet delovanja ne može da se poveže sa efektom na COX-2, ali ni sa količinom produkovanih PGE₂ i TXA₂. Takođe, nije uočena direktna korelacija između hemijskog sastava i uticaja na nivo produkcije PGE₂ i TXA₂. Prikazani rezultati pokazuju da su složene signalne kaskade uključene u ekspresiju ovih enzima i upućuju na potrebu za daljim ispitivanjima, prvenstveno na nivou translacije i direktne inhibicije enzima.

Uopšteno, u okviru ove doktorske disertacije je prvi put ispitan uticaj vrsta *P. argentea* i *P. media* na produkciju PGE₂ i TXA₂ u inflamatornim procesima. Takođe, pored nesumnjive potvrde anti-inflamatorne aktivnosti tradicionalno korišćenih *P. lanceolata* i *P. major*, do sada nedovoljno ispitana vrsta *P. altissima* se može izdvojiti kao vrsta koja ima potencijal novog, bezbednog anti-inflamatornog agensa i koja zasigurno treba detaljno da se ispita u narednim fazama. Deo rezultata ove faze istraživanja publikovan je u radu Majkić i saradnici (2020).

Uzorci *Merlot* vina su bili drugi izvor polifenolnih jedinjenja koji je analiziran u ovom radu. Ispitan je polifenolni sastav i anti-inflamatorni potencijal 17 *Merlot* vina: 12 *Merlot* vina proizvedenih u Vojvodini, i po jedno iz Francuske, Italije, Makedonije, Slovenije i Španije (*oznake uzoraka Merlot vina*: vina iz Srbije - M1-12 i vina iz Francuske, Italije, Makedonije, Slovenije i Španije - MFR, MIT, MMA, MSL i MSP, redom).

Spektrofotometrijskim metodama je određen sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida, tanina i antocijana, a rezultati su pokazali da francusko vino odlikuje visok sadržaj sve četiri klase analiziranih polifenolnih jedinjenja. Po visokom sadržaju antocijana uz francusko *Merlot* vino (86.3 mg ME/L), izdvojilo se i vojvođansko vino M3 (79.9 mg ME/L). Od vojvođanskih vina, u uzorku M4 detektovane su najveće koncentracije polifenola, tanina i flavonoida, dok je sa druge strane, sadržaj antocijana bio nizak. Rezultati HPLC-UV/VIS analize polifenolnog profila pokazuju da su od 21 analiziranog jedinjenja, dominantna polifenolna jedinjenja u svim uzorcima bili galna kiselina (14.3–58.3 mg/L), katehin (9.10–49.3 mg/L) i malvidin-3-*O*-glukozid (2.63–66.5 mg/L). Iako nisu bili prisutni u visokim koncentracijama, kvercetin, rutin i *p*-kumarinska kiselina su najviše doprineli grupisanju *Merlot* vina iz Francuske, Italije, Makedonije, Slovenije i Španije i njihovom diferenciranju od vojvođanskih uzoraka.

Model sistem u kom je analiziran uticaj 17 uzoraka *Merlot* vina na produkciju PGE₂ i TXA₂, kao i ekspresiju enzima uključenih u sintezu ovih lipidnih signalnih molekula su predstavljale U937 makrofage u kojima je dodatkom LPS indukovana inflamacija. Šest uzoraka *Merlot* vina redukovalo je produkciju PGE₂ u opsegu od 12.6 (MSLO) do 34.5% (M10), pri čemu su vojvođanska vina (M4, M6, M10 i M11) ispoljila najbolji potencijal. Analizirana vina ispoljavaju bolju inhibiciju produkcije TXA₂ nego PGE₂ - od analiziranih 17, 10 vina je značajno smanjilo produkciju TXA₂ u odnosu na kontrolu. Dva analizirana vina (M4 i M10) su supresovala uticaj LPS na ekspresiju cPLA₂ α mRNK. Nije zapažena korelacija između sadržaja ni jedne klase polifenolnih jedinjenja, kao ni pojedinačnih polifenola, i ispitane biološke aktivnosti. Međutim, može se uočiti da sadržaji svih dominantnih jedinjenja detektovanih u uzorcima vina, uz izuzetak galne kiseline, imaju veće koeficijente korelacije sa inhibicijom nivoa produkcije TXA₂ nego PGE₂. Dobijeni rezultati pokazuju da modulacija ciklooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline može da bude jedan od mehanizama kardioprotektivnog delovanja vina. Prema dostupnim podacima, pretpostavlja se da je ovo prvi put da je ispitan uticaj *Merlot* vina na produkciju PGE₂ u *in vitro* modelu inflamacije, a ovi rezultati su objavljeni 2019. godine (Majkić i sar., 2019).

Ekstrakti bokvica i uzorci vina su bogat izvor polifenolnih jedinjenja, a njihov umereni potencijal inhibicije produkcije PGE₂ i TXA₂ je verovatno posledica sinergističkog delovanja prisutnih biološki aktivnih jedinjenja. Međutim, statističkom obradom podataka uglavnom je utvrđena slaba korelacija između ispoljene aktivnosti i sadržaja dominantnih jedinjenja, kako u bokvicama, tako i u vinima, te je bilo neophodno ispitati da li odabrana jedinjenja mogu samostalno da ispolje aktivnost u primenjenom model sistemu, odnosno da li pri primenjenim eksperimentalnim uslovima zaista doprinose datoj aktivnosti. Deo rezultata koji se odnose na ispitivanje uticaja odabranih polifenola na produkciju PGE₂ i TXA₂ i ekspresiju enzima uključenih u

njihovu sintezu publikovan je u dva rada: Majkić i saradnici (2019) i Majkić i saradnici (2020).

U nestimulisanim monocitima ispitan je sposobnost odabranih jedinjenja da inhibiraju aktivnost COX-1 i sa njom kuplovanih enzima uključenih u produkciju PGE₂ i TXA₂ tokom homeostaze. Analizirano je 15 jedinjenja (3 fenolne kiseline, 2 flavona i po jedan njihov glukozid i glukuronid, 2 flavan-3-ola, 1 flavonol, 1 stilben, 1 triterpenska kiselina, 1 iridoid) i 4 standardna inhibitora ciklooksigenaza. U pogledu uticaja na produkciju PGE₂ tokom homeostaze, kao najaktivnija jedinjenja su se izdvojili hlorogenska kiselina i luteolin, kao i luteolin-7-*O*-glukozid i luteolin-7-*O*-glukuronid. Prilikom inhibicije produkcije TXA₂ najbolji potencijal su ispoljili hlorogenska kiselina i apigenin-7-*O*-glukozid koji su pri koncentraciji 25 µmol/L snizili produkciju TXA₂ na 38.3 i 48.6% u odnosu na količinu koja je produkovana u kontroli. Pri koncentraciji od 2.5 µmol/L, najbolju aktivnost ispoljio je luteolin-7-*O*-glukuronid.

Uopšteno, u homeostatskim uslovima, luteolin i luteolin-7-*O*-glukuronid su ispoljili najbolji potencijal inhibicije oba metabolita arahidonske kiseline, i PGE₂ i TXA₂.

U cilju određivanja uticaja odabranih polifenola, aukubina i ursolne kiseline, na produkciju PGE₂ i TXA₂ u inflamaciji, njihova aktivnost je ispitana i u monocitima u kojima je inflamacija indukovana dodatkom LPS. PGE₂ inhibitorni potencijal aktivnih jedinjenja bio je u opsegu od 11.8% koliko je ispoljila kafena kiselina (2.5 µmol/L) do 42.5% koliko je pokazao pterostilben (1 µmol/L). Na osnovu prikazanih rezultata, uočava se da su od jedinjenja analiziranih pri koncentraciji 2.5 µmol/L flavoni pokazali malo bolju aktivnost u odnosu na druge klase polifenolnih jedinjenja. Analogno aktivnosti u nestimulisanim monocitima, luteolin se i u ovom model sistemu izdvojio kao jedno od najaktivnijih jedinjenja. U pogledu uticaja na produkciju TXA₂ u stimulisanim monocitima, aktivnost galne kiseline, rezveratrola, ursolne kiseline i aukubina je bila u istom nivou kao i aktivnost standardnih inhibitora ciklooksigenaza, sa vodećim indometacinom.

Uopšteno, u ranim fazama inflamatornog procesa, kao najbolji inhibitori produkcije PGE₂ izdvojili su se apigenin, apigenin-7-*O*-glukozid, luteolin, luteolin-7-*O*-glukozid, floretin, pterostilben i aukubin, a najznačajniju inhibiciju produkcije TXA₂ postigli su galna kiselina, apigenin, luteolin-7-*O*-glukozid, rezveratrol, ursolna kiselina i aukubin.

Pored poznatog efekta na ekspresiju COX-2 mRNA, koju od 17 analiziranih jedinjenja nisu redukovali samo floretin, hlorogenska kiselina i aukubin, interesantni su rezultati uticaja na ekspresiju drugih enzima. Naime, u okviru ove doktorske disertacije je, prema nama dostupnim podacima, prvi put analiziran modulatorni efekat navedenih jedinjenja na ekspresiju svih enzima uključenih u produkciju PGE₂ i TXA₂.

Svi flavoni su snizili ekspresiju COX-2 mRNA pri čemu se uočava isti poredak i kod apigenina i kod luteolina: najaktivniji su glukuronidi, zatim aglikoni, dok su glukozidi bili najmanje aktivni. Zanimljivi su i rezultati uticaja flavona na ekspresiju mPGES-2 mRNA, jer su jedino glukuronidi redukovali, dok je apigenin povećao. Apigenin-7-*O*-glukozid i luteolin redukovali ekspresiju TXAS mRNA. Na osnovu prikazanih rezultata, uočava se da aglikoni, glukozidi i glukuronidi istog flavona mogu da imaju potpuno suprotno dejstvo na jedan signalni put, a s obzirom da tokom

apsorpcije dolazi do njihove međusobne konverzije, značajno je ispitati aktivnost različitih derivata.

Analizirani flavan-3-oli (katehin i epikatehin) i flavonol (miricetin) su ispoljili sličnu aktivnost: slab efekat na ekspresiju $cPLA_2\alpha$ i COX-1 mRNK, koja je samo epikatehin redukovao. Sva tri jedinjenja su snažno supresovala ekspresiju COX-2 mRNK u odnosu na kontrolu: epikatehin 12, miricetin 10, a katehin 9 puta. Ni jedno od ovih jedinjenja nije imalo značajan uticaj na ekspresiju mRNK terminalnih enzima uključenih u produkciju PGE_2 , a epikatehin i miricetin su povećali ekspresiju TXAS mRNK.

Stilbeni, pterostilben i rezveratrol, imaju sličan nivo delovanja na ekspresiju mRNK enzima uključenih u produkciju PGE_2 i TXA_2 . Najveća razlika je uočena kod uticaja na ekspresiju $cPLA_2\alpha$ i COX-1 mRNK, koje je pterostilben smanjio, odnosno mPGES-2, koju je povećao. Zanimljivo je da je rezveratrol skoro dvostruko povećao ekspresiju TXAS, a sa druge strane smanjio produkciju TXA_2 . Kako je pterostilben analiziran pri 2.5 puta nižoj koncentraciji, njegov modulacioni potencijal ciklooksigenaznog puta arahidonske kiseline je znatno snažniji.

Uz izuzetak ekspresije COX-1 mRNK koju su smanjile i galna i hlorogenska kiselina, uticaj hlorogenske kiseline, sa jedne strane, i kafene i galne kiseline, sa druge strane je bio obrnut u slučajevima ekspresije mRNK enzima uključenih u produkciju PGE_2 i TXA_2 . Hlorogenska kiselina je povećala ekspresiju COX-2 i cPGES mRNK, a redukovala ekspresiju mPGES-1 i TXAS mRNK. Efekat koji su fenolne kiseline ispoljile na ekspresiju mRNK odabranih enzima ciklooksigenaznog puta ne može da se poveže sa krajnjim uticajem na produkciju metabolita. Naime, hlorogenska kiselina je najviše smanjila produkciju PGE_2 , iako je povisila ekspresiju COX-2 mRNK, a sa druge strane galna kiselina koja je 5.9 puta smanjila ekspresiju COX-2 mRNK, imala je neznatan uticaj na produkciju PGE_2 . Nasuprot tome, galna kiselina je najviše redukovala produkciju TXA_2 , iako je povećala ekspresiju terminalnog enzima uključenog u njegovu produkciju.

Iridoid aukubin je statistički značajno snizio ekspresiju $cPLA_2\alpha$, COX-1 i TXAS mRNK, što je verovatno doprinelo redukciji produkcije analiziranih metabolita, prvenstveno TXA_2 . Ursolna kiselina je značajno supresovala ekspresiju COX-2 i TXAS mRNK. Takođe, kao što je i prethodno uočeno kod nekih jedinjenja koja su smanjila ekspresiju COX-2 mRNK, i ursolna kiselina je povećala ekspresiju mRNK drugog proinflatornog enzima, mPGES-1.

Uopšteno, u ranim fazama inflamatornog procesa, na smanjenje ekspresije mRNK ključnog enzima za oslobađanje arahidonske kiseline - $cPLA_2\alpha$ najjači uticaj su imali luteolin, pterostilben i aukubin, dok su apigenin, apigenin-7-*O*-glukuronid, luteolin, luteolin-7-*O*-glukozid, galna kiselina, epikatehin, katehin, miricetin, pterostilben i rezveratrol do deset puta smanjili ekspresiju COX-2 mRNK, ali je većina njih istovremeno povećala ekspresiju mRNK inducibilne mPGES-1. Apigenin-7-*O*-glukozid, luteolin, floretin, aukubin, hlorogenska i ursolna kiselina su supresovali ekspresiju TXAS mRNK. Ipak, nije uočena jasna korelacija između nivoa inhibicije produkcije PGE_2 i TXA_2 i ekspresije mRNK enzima koji su uključeni u njihovu sintezu, što ukazuje na kompleksnost regulacije ovog metaboličkog puta i moguće mehanizme inhibitornog delovanja na nivou sinteze proteina ili inhibicije aktivnosti samog enzima.

U LPS-stimulisanim makrofagama (model sistem kasnije faze inflamatornog procesa) evaluiran je modulatorni efekat 10 jedinjenja prisutnih u vinu na produkciju PGE₂ i TXA₂. Fenolne kiseline su najviše redukovale produkciju PGE₂, dok su rezveratrol, galna i kafena kiselina najbolji inhibitori produkcije TXA₂. Uopšteno, na osnovu navedenih rezultata, može da se pretpostavi da analizirana polifenolna jedinjenja mogu da doprinesu potencijalu ekstrakata bokvica i uzoraka vina da moduliraju produkciju PGE₂ i TXA₂.

Poslednja faza istraživanja, predstavljala je primenu optimizovane metode za ispitivanje potencijalnog anti-inflamatornog efekta novosintetisanih jedinjenja. Ispitana je sposobnost trifluorometilovanih derivata, kod kojih je ova grupa vezana za alifatični ostatak: β-laktam (*trans-1* i *trans-2*), amino-estar (**3**) ili 2-imidazolinov prsten (*trans-4*), da inhibiraju produkciju PGE₂ i TXA₂ i ekspresiju mRNK COX-1, COX-2 i cPLA₂α u LPS-stimulisanim U937 makrofagama. Najbolju aktivnost ispoljilo je jedinjenje *trans-4*, koje se izdvojilo kao potencijalni anti-inflamatorni agens. Navedeni rezultati su publikovani u naučnom časopisu visoke kategorije (Beara i sar., 2020).

Sumirano, najvažniji zaključci i rezultati istraživanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije su:

- U937 monociti i makrofage predstavljaju pogodan *in vitro* biološki sistem za analizu uticaja različitih uzoraka na produkciju PGE₂ i TXA₂ u inflamaciji i mogu se koristiti kao relevantni sistem za primarni skrining anti-inflamatorne aktivnosti.

- Od šest ispitanih vrsta bokvica, *P. altissima* je ispoljila najbolju aktivnost pri inhibiciji produkcije PGE₂ i ekspresije COX-2 mRNK u početnim fazama inflamacije, te se može izdvojiti kao vrsta sa značajnim anti-inflamatornim potencijalom. Iako direktna korelacija između hemijskog sastava ekstrakata bokvica i uticaja na nivo produkcije PGE₂ i TXA₂ nije uočena, mnoga od detektovanih jedinjenja, kao što su na primer aukubin, akteozid, hlorogenska kiselina, apigenin i luteolin su poznata po dobroj biološkoj aktivnosti i blagotvornom dejstvu na zdravlje, te prikazani rezultati sugerišu na potrebu za daljim ispitivanjima biološke aktivnosti u cilju otkrivanja novih mehanizama delovanja ovih vrsta.

- *Merlot* vina ispoljavaju bolji potencijal inhibicije TXA₂ nego PGE₂, što verovatno doprinosi njihovom kardioprotektivnom delovanju („Francuski paradoks“). Prema dostupnim podacima, pretpostavlja se da je ovo prvi put da je ispitan uticaj *Merlot* vina na produkciju PGE₂ u *in vitro* modelu inflamacije.

- Tokom homeostaze, luteolin i luteolin-7-*O*-glukuronid su ispoljili najbolju inhibiciju produkcije PGE₂ i TXA₂.

- U početnim fazama inflamacije, pterostilben je najbolje inhibirao produkciju PGE₂, a najznačajniju inhibiciju produkcije TXA₂ postigli su galna kiselina, apigenin, luteolin-7-*O*-glukozid, rezveratrol, ursolna kiselina i aukubin. Polifenoli su modulirali ekspresiju mRNK enzima uključenih u produkciju PGE₂ i TXA₂. Luteolin, pterostilben i aukubin su inhibirali ekspresiju cPLA₂α mRNK, a najjači uticaj na redukciju ekspresije COX-2 mRNK imali su epikatehin, katehin, miricetin i luteolin. Većina jedinjenja koja je smanjila ekspresiju COX-2 mRNK, istovremeno je povećala ekspresiju mPGES-1 mRNK. Apigenin-7-*O*-glukozid, luteolin, aukubin i ursolna kiselina su snažno supresovali ekspresiju TXAS mRNK.

- U kasnijoj fazi inflamatornog odgovora, fenolne kiseline (protokatehinska i galna kiselina) su najviše redukovale produkciju PGE₂, dok su rezveratrol, galna i kafena kiselina najbolji inhibitori produkcije TXA₂.

- Na osnovu prikazanih rezultata, uočava se da polifenolna jedinjenja moduliraju produkciju PGE₂ i TXA₂ različitim mehanizmima, što upućuje na potrebu za novim pravcem istraživanja: pronalaženje optimalnih kombinacija polifenola koji će delovanjem u različitim fazama metabolizma arahidonske kiseline efikasno inhibirati produkciju PGE₂ i TXA₂ u procesima inflamacije.

8. Literatura

- Agouni, A., Mostefai, H. A., Lagrue, A. H., Sladkova, M., Rouet, P., Desmoulin, F., Pechanova, O., Martinez, M.C., Andriantsitohaina, R. (2017). Paradoxical effect of nonalcoholic red wine polyphenol extract, Provinols™, in the regulation of cyclooxygenases in vessels from Zucker fatty rats (*fa/fa*). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017.
- Alam, M. I., Alam, M. A., Alam, O., Nargotra, A., Taneja, S. C., & Koul, S. (2016). Molecular modeling and snake venom phospholipase A2 inhibition by phenolic compounds: Structure-activity relationship. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 114, 209–219.
- Alanko, J., Riutta, A., Vapaatalo, H. (1995). Phenols inhibit prostaglandin E₂ synthesis in A23187-stimulated human whole blood and modify the ratio of arachidonic acid metabolites. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 52(5), 299–301.
- Alipieva, K., Korkina, L., Orhan, I. E., & Georgiev, M. I. (2014). Verbascoside - A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnology Advances*, 32(6), 1065–1076.
- Almeida Junior, S. de. (2019). *In vivo* methods for the evaluation of anti-inflammatory and antinoceptive potential. *Brazilian Journal of Pain*, 2(4), 386–389.
- Amini, M., Kherad, M., Mehrabani, D., Azarpira, N., Panjehshahin, M. R., & Tanideh, N. (2010). Effect of *Plantago major* on burn wound healing in rat. *Journal of Applied Animal Research*, 37(1), 53-56.
- Andreani, M., Olivier, J. L., Berenbaum, F., Raymondjean, M., Béréziat, G. (2000). Transcriptional regulation of inflammatory secreted phospholipases A₂. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488(1–2), 149–158.
- Angel-Morales, G., Noratto, G., & Mertens-Talcott, S. (2012). Red wine polyphenolics reduce the expression of inflammation markers in human colon-derived CCD-18Co myofibroblast cells: potential role of microRNA-126. *Food & function*, 3(7), 745-752.
- Anli, R. E., Vural, N. (2009). Antioxidant phenolic substances of Turkish red wines from different wine regions. *Molecules*, 14(1), 289–297.
- Arcari, S. G., Caliarì, V., Sganzerla, M., Godoy, H. T. (2017). Volatile composition of Merlot red wine and its contribution to the aroma: optimization and validation of analytical method. *Talanta*, 174(January), 752–766.
- Arefi, H., Naderi, N., Shemirani, A. B. I., Kiani Falavarjani, M., Azami Movahed, M., Zarghi, A. (2020). Design, synthesis, and biological evaluation of new 1,4-diarylazetid-2-one derivatives (β -lactams) as selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Archiv Der Pharmazie*, 353(3),e1900293.
- Arnold, E., Benz, T., Zapp, C., Wink, M. (2015). Inhibition of cytosolic phospholipase A₂ α (cPLA₂ α) by Medicinal plants in relation to their phenolic content. *Molecules*, 20(8), 15033–15048.
- Auger, C., Teissedre, P. L., Gérard, P., Lequeux, N., Bornet, A., Serisier, S., Besançon, P., Caporiccio, B., Cristol, J.P., Rouanet, J. M. (2005). Dietary wine phenolics catechin, quercetin, and resveratrol efficiently protect hypercholesterolemic hamsters against aortic fatty streak accumulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2015-2021
- Bae, Y., Lee, S., Kim, S. H. (2011). Chrysin suppresses mast cell-mediated allergic inflammation: Involvement of calcium, caspase-1 and nuclear factor- κ B. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 254(1), 56–64.
- Bahadori, M. B., Sarikurkcu, C., Kocak, M. S., Calapoglu, M., Uren, M. C., Ceylan, O. (2020). *Plantago lanceolata* as a source of health-beneficial phytochemicals: Phenolics profile and antioxidant capacity. *Food Bioscience*, 34, 100536
- Banerjee, T., Van der Vliet, A., Ziboh, V. A. (2002). Downregulation of COX-2 and iNOS by amentoflavone and quercetin in A549 human lung adenocarcinoma cell line. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 66(5-6), 485–92.
- Bauer, J., Koeberle, A., Dehm, F., Pollastro, F., Appendino, G., Northoff, H., Rossi, A., Sautebin, L., Werz, O. (2011). Arzanol, a prenylated heterodimeric phloroglucinyl pyrone, inhibits eicosanoid biosynthesis and exhibits anti-inflammatory efficacy *in vivo*. *Biochemical pharmacology*, 81(2), 259-268.
- Bauer, J., Kuehn, S., Rollinger, J. M., Scherer, O., Northoff, H., Stuppner, H., Wery, O., Koeberle, A. (2012). Carnosol and carnosic acids from *Salvia officinalis* inhibit microsomal prostaglandin E₂ synthase-1. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 342(1), 169–176.
- Baumgartner, L., Sosa, S., Atanasov, A. G., Bodensieck, A., Fakhrudin, N., Bauer, J., Favero, G.D., Ponti, C., Heiss, E.H., Schwaiger, S., Ladurner, A., Widiwity, U., Loggia, R.D., Rollinger, J.M., Werz, O., Bauer, R., Dirsch, V.M., Tubaro, A., Stuppner, H. (2011). Lignan derivatives from *Krameria lappacea* roots inhibit acute inflammation *in vivo* and pro-inflammatory mediators *in vitro*. *Journal of natural products*, 74(8), 1779-1786.

- Beara, I. N., Lesjak, M. M., Jovin, E. Đ., Balog, K. J., Anackov, G. T., Orcic, D. Z., Mimica-Dukic, N. M. (2009). Plantain (*Plantago* L.) species as novel sources of flavonoid antioxidants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(19), 9268-9273.
- Beara, I. N., Lesjak, M. M., Orčić, D. Z., Simin, N. D., Četojević-Simin, D. D., Božin, B. N., Mimica-Dukić, N. M. (2012). Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of two closely-related *Plantain* species: *Plantago altissima* L. and *Plantago lanceolata* L. *LWT - Food Science and Technology*, 47(1), 64–70.
- Beara, I. N., Orčić, D. Z., Lesjak, M. M., Mimica-Dukić, N. M., Peković, B. A., Popović, M. R. (2010). Liquid chromatography/tandem mass spectrometry study of anti-inflammatory activity of Plantain (*Plantago* L.) species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52(5), 701–706.
- Beara, I. N., Torović, L. D., Pintać, D., Majkić, T. M., Orčić, D. Z., Mimica-Dukić, N. M., Lesjak, M. M. (2017). Polyphenolic profile, antioxidant and neuroprotective potency of grape juices and wines from Fruška Gora region (Serbia). *International Journal of Food Properties*, 20, S2552-S2568.
- Beara, I., Majkić, T., Fioravanti, S., Trulli, L., Mimica-Dukić, N., Pellacani, L., Saso, L. (2020). The effects of trifluoromethylated derivatives on prostaglandin E₂ and thromboxane A₂ production in human leukemic U937 macrophages. *Medicinal Chemistry*, 16(1), 63–68.
- Beloqui, O., Páramo, J. A., Orbe, J., Benito, A., Colina, I., Monasterio, A., Díez, J. (2005). Monocyte cyclooxygenase-2 overactivity: A new marker of subclinical atherosclerosis in asymptomatic subjects with cardiovascular risk factors? *European Heart Journal*, 26(2), 153–158.
- Bergqvist, F., Morgenstern, R., Jakobsson, P. J. (2020). A review on mPGES-1 inhibitors: From preclinical studies to clinical applications. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 147(May 2019), 106383.
- Bergqvist, F., Ossipova, E., Idborg, H., Raouf, J., Checa, A., Englund, K., Englund, P., Khoonsari, P.E., Kultima, K., Wheelock, C.E., Larsson, K., Korotkova, M., Jakobsson, P. J. (2019). Inhibition of mPGES-1 or COX-2 results in different proteomic and lipidomic profiles in A549 lung cancer cells. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 636.
- Blewett, A. J., Varma, D., Gilles, T., Libonati, J. R., Jansen, S. A. (2008). Development and validation of a high-performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry method for the simultaneous determination of 23 eicosanoids. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 46(4), 653-662.
- Blobaum, A. L., Uddin, M. J., Felts, A. S., Crews, B. C., Rouzer, C. A., Marnett, L. J. (2013). The 2'-trifluoromethyl analogue of indomethacin is a potent and selective COX-2 inhibitor. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 4(5), 486–490.
- Born, G. (2012). Platelets: Past, present and future. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 210, 261–286.
- Boskabady, M. H., Rakhshandah, H., Afiat, M., Aelami, Z., Amiri, S. (2006). Antitussive effect of *Plantago lanceolata* in guinea pigs. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 31(3), 143–146.
- Brash, A. R. (2001). Arachidonic acid as a bioactive molecule. *The Journal of clinical investigation*, 107(11), 1339-1345.
- Brenneis, C., Maier, T. J., Schmidt, R., Hofacker, A., Zulauf, L., Jakobsson, P.-J., Scholich, K., Geisslinger, G. (2006). Inhibition of prostaglandin E₂ synthesis by SC-560 is independent of cyclooxygenase 1 inhibition. *The FASEB Journal*, 20(9), 1352–1360.
- Burke, J. E., Dennis, E. A. (2009). Phospholipase A₂ structure/function, mechanism, and signaling. *Journal of Lipid Research*, 50(SUPPL.), 237–242.
- Calabriso, N., Scoditti, E., Massaro, M., Pellegrino, M., Storelli, C., Ingrosso, I., Giovinazzo, G., Carluccio, M. A. (2016). Multiple anti-inflammatory and anti-atherosclerotic properties of red wine polyphenolic extracts: differential role of hydroxycinnamic acids, flavonols and stilbenes on endothelial inflammatory gene expression. *European Journal of Nutrition*, 55(2), 477–489.
- Candelario-Jalil, E., de Oliveira, A. C. P., Gräf, S., Bhatia, H. S., Hüll, M., Muñoz, E., Fiebich, B. L. (2007). Resveratrol potently reduces prostaglandin E₂ production and free radical formation in lipopolysaccharide-activated primary rat microglia. *Journal of Neuroinflammation*, 4, 1–12.
- Carrillo-Ocampo, D., Bazaldúa-Gómez, S., Bonilla-Barbosa, J. R., Aburto-Amar, R., Rodríguez-López, V. (2013). Anti-inflammatory activity of iridoids and verbascoside isolated from *Castilleja tenuiflora*. *Molecules*, 18(10), 12109–12118.
- Cathcart, M. C., Gately, K., Cummins, R., Kay, E., O'Byrne, K. J., Pidgeon, G. P. (2011). Examination of thromboxane synthase as a prognostic factor and therapeutic target in non-small cell lung cancer. *Molecular Cancer*, 10, 1–14.

- Cathcart, M. C., Reynolds, J. V., O'Byrne, K. J., Pidgeon, G. P. (2010). The role of prostacyclin synthase and thromboxane synthase signaling in the development and progression of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1805(2), 153–166.
- Caughey, G. E., Cleland, L. G., Penglis, P. S., Gamble, J. R., James, M. J. (2001). Roles of Cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in Prostanoid Production by Human Endothelial Cells: Selective Up-Regulation of Prostacyclin Synthesis by COX-2. *The Journal of Immunology*, 167(5), 2831–2838.
- Cerella, C., Sobolewski, C., Dicato, M., Diederich, M. (2010). Targeting COX-2 expression by natural compounds: A promising alternative strategy to synthetic COX-2 inhibitors for cancer chemoprevention and therapy. *Biochemical Pharmacology*, 80(12), 1801–1815.
- Chandrasekharan, N. V., Simmons, D. L. (2004). The cyclooxygenases. *Genome biology*, 5, 2004-5.
- Chang, C. C., Yang, H. M., Chern, J. C. (2002): Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. 10(3), 178-182.
- Chanput, W., Peters, V., Wichers, H. (2015). THP-1 and U937 Cells. In *The impact of food bioactives on health* (pp. 147-159). Springer, Cham.
- Chao, C. L., Weng, C. S., Chang, N. C., Lin, J. S., Kao, S. Te, Ho, F. M. (2010). Naringenin more effectively inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in macrophages than in microglia. *Nutrition Research*, 30(12), 858–864.
- Chen, C. H., Lin, Y. S., Chien, M. Y., Hou, W. C., Hu, M. L. (2012)a. Antioxidant and antihypertensive activities of acteoside and its analogs. *Botanical Studies*, 53(4), 421–429.
- Chen, C. K., Poole, E. M., Ulrich, C. M., Kulmacy, R.J., Wang, L. (2012)b. Functional analysis of human thromboxane synthase polymorphic variants. *Pharmacogenetics and Genomics Polymorphic Variants*. 22(9), 653–658.
- Chen, C. Y., Peng, W. H., Tsai, K. D., Hsu, S. L. (2007). Luteolin suppresses inflammation-associated gene expression by blocking NF- κ B and AP-1 activation pathway in mouse alveolar macrophages. *Life Sciences*, 81(23-24), 1602–1614.
- Chen, X., Lu, J., An, M., Ma, Z., Zong, H., Yang, J. (2014). Anti-inflammatory effect of resveratrol on adjuvant arthritis rats with abnormal immunological function via the reduction of cyclooxygenase 2 and prostaglandin E₂. *Molecular medicine reports*, 9(6), 2592-2598.
- Chen, Y. C., Shen, S. C., Chen, L. G., Lee, T. J., Yang, L. L. (2001). Wogonin, baicalin, and baicalein inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions induced by nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide. *Biochemical Pharmacology*, 61(11), 1417–27.
- Chiang, L. C., Chiang, W., Chang, M. Y., Lin, C. C. (2003). *In vitro* cytotoxic, antiviral and immunomodulatory effects of *Plantago major* and *Plantago asiatica*. *The American journal of Chinese medicine*, 31(02), 225-234.
- Chiang, L. C., Chiang, W., Chang, M. Y., Ng, L. T., Lin, C. C. (2002). Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds *in vitro*. *Antiviral research*, 55(1), 53-62.
- Chimal-Ramírez, G. K., Espinoza-Sánchez, N. A., Chávez-Sánchez, L., Arriaga-Pizano, L., Fuentes-Pananá, E. M. (2016). Monocyte Differentiation towards Protumor Activity Does Not Correlate with M1 or M2 Phenotypes. *Journal of Immunology Research*, 2016.
- Chiou, Y., Tsai, M., Nagabhushanam, K., Wang, Y., Wu, C., Ho, C., Pan, M. (2011). Pterostilbene Is More Potent than Resveratrol in Preventing Azoxymethane (AOM) -Induced Colon Tumorigenesis via Activation of the NF-E2-Related Factor 2 (Nrf2) -Mediated Antioxidant Signaling Pathway. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59 (6), 2725–2733.
- Chira, K., Pacella, N., Jourdes, M., Teissedre, P. (2011). Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet-Sauvignon and Merlot) and correlation with wine age. *Food Chemistry*, 126(4), 1971–1977.
- Cho, H., Yun, C. W., Park, W. K., Kong, J. Y., Kim, K. S., Park, Y., Kim, B. K. (2004). Modulation of the activity of pro-inflammatory enzymes, COX-2 and iNOS, by chrysin derivatives. *Pharmacological Research*, 49(1), 37-43.
- Cho, Y. C., Park, J., Cho, S. (2020). Anti-Inflammatory and Anti-Oxidative Effects of luteolin-7-O-glucuronide in LPS-Stimulated Murine Macrophages through TAK1 Inhibition and Nrf2 Activation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6).
- Choi, K. A., Park, S. J., Yu, Y. G. (2010). Development of a coupled enzyme assay method for microsomal prostaglandin E synthase activity. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 31(2), 384–388.

- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*, 162(1), 156-159
- Chuang, D. Y., Simonyi, A., Cui, J., Lubahn, D. B., Gu, Z., Sun, G. Y. (2016). Botanical polyphenols mitigate microglial activation and microglia-induced neurotoxicity: role of cytosolic phospholipase A₂. *NeuroMolecular Medicine*, 18(3), 415-425.
- Chun, K. S., Surh, Y. J. (2004). Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: Potential molecular targets for chemoprevention. *Biochemical Pharmacology*, 68(6), 1089-1100.
- Cipollone, F. (2005). COX-2 and prostaglandins in atherosclerosis. *Lupus*, 14(9), 756-759.
- Compendium of International Methods of Analysis - OIV, HPLC Determination of Nine Major Anthocyanins in Red and Rose Wine (MA-AS315-11); International Organization of Vine and Wine: Paris, France, 2013
- Crescente, M., Jessen, G., Momi, S., Höltje, H. D., Gresele, P., Cerletti, C., De Gaetano, G. (2009). Interactions of gallic acid, resveratrol, quercetin and aspirin at the platelet cyclooxygenase-1 level: Functional and modelling studies. *Thrombosis and Haemostasis*, 102(2), 336-346.
- Crescente, M., Menke, L., Chan, M. V., Armstrong, P. C., Warner, T. D. (2019). Eicosanoids in platelets and the effect of their modulation by aspirin in the cardiovascular system (and beyond). *British Journal of Pharmacology*, 176(8), 988-999.
- Cui, X., Jin, Y., Hofseth, A. B., Pena, E., Habiger, J., Chumanevich, A., Hofseth, L. J. (2010). Resveratrol suppresses colitis and colon cancer associated with colitis. *Cancer prevention research*, 3(4), 549-559.
- Curtis-Prior, P. (Ed.): (2004): The eicosanoids. John Wiley Sons. England.
- Da Silva, S. L., Calgarotto, A. K., Char, J. S., Marangoni, S. (2008). Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* SW aqueous extract with anti-PLA₂ activity. *Toxicon*, 52(6), 655-666.
- da Silva, S. L., Calgarotto, A. K., Maso, V., Damico, D. C. S., Baldasso, P., Veber, C. L., Villar, J.A:F.P., Oliveira A.R:M. ComarM. Jr., Olivira K.M T., Marangoni, S. (2009). Molecular modeling and inhibition of phospholipase A₂ by polyhydroxy phenolic compounds. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(1), 312-321.
- Daikoku, T., Wang, D., Tranguch, S., Morrow, J. D., Orsulic, S., DuBois, R. N., Dey, S. K. (2005). Cyclooxygenase-1 is a potential target for prevention and treatment of ovarian epithelial cancer. *Cancer research*, 65(9), 3735-3744.
- Dajić Stevanović, Z., Stešević, D., Pljevljakušić, D. (2013). Priručnik za sakupljače lekovitog bilja. Plužine (Crna Gora), opština Ljubovija (Srbija).
- Dalar, A., Türker, M., Konczak, I. (2012). Antioxidant capacity and phenolic constituents of *Malva neglecta* Wallr. and *Plantago lanceolata* L. from Eastern Anatolia Region of Turkey. *Journal of Herbal Medicine*, 2(2), 42-51.
- Daudt, C. E., Fogaça, A. D. O. (2013). Phenolic compounds in Merlot wines from two wine regions of Rio Grande do Sul, Brazil *Food Science and Technology*, 33(2), 355-361.
- Davies, N. M., Good, R. L., Roupe, K. A., Yáñez, J. A. (2004). Cyclooxygenase-3: Axiom, dogma, anomaly, enigma or splice error? - Not as easy as 1, 2, 3. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(2), 217-226.
- Delmondes, P. H., Stefani, R. (2018). Molecular docking studies of natural phenolic compound and derivatives with phospholipase A₂. *Orbital*, 10(6), 467-474.
- DeLong, C. J., Smith, W. L. (2005). An intronic enhancer regulates cyclooxygenase-1 gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(1), 53-61.
- Demasi, M., Caughey, G. E., James, M. J., Cleland, L. G. (2000). Assay of cyclooxygenase-1 and 2 in human monocytes. *Inflammation Research*, 49(12), 737-743.
- Dessen, A., Tang, J., Schmidt, H., Stahl, M., Clark, J. D., Sehra, J., Somers, W. S. (1999). Crystal structure of human cytosolic phospholipase A₂ reveals a novel topology and catalytic mechanism. *Cell*, 97(3), 349-360.
- Diaz, A., Chepenik, K. P., Korn, J. H., Reginato, A. M., Jimenez, S. A. (1998). Differential regulation of cyclooxygenases 1 and 2 by interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α , and transforming growth factor- β 1 in human lung fibroblasts. *Experimental cell research*, 241(1), 222-229.
- Diebolt, M., Bucher, B., & Andriantsitohaina, R. (2001). Wine polyphenols decrease blood pressure, improve NO vasodilatation, and induce gene expression. *Hypertension*, 38(2), 159-165.

- Dileep, K. V., Remya, C., Cerezo, J., Fassihi, A., Pérez-Sánchez, H., Sadasivan, C. (2015). Comparative studies on the inhibitory activities of selected benzoic acid derivatives against secretory phospholipase A₂, a key enzyme involved in the inflammatory pathway. *Molecular BioSystems*, 11(7), 1973–1979.
- Dimitrovska, M., Tomovska, E., Bocevska, M. (2013). Characterisation of Vranec, Cabernet Sauvignon and Merlot wines based on their chromatic and anthocyanin profiles. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 78(9), 1309–1322.
- Dogné, J.-M., Hanson, J., Leval, X., Pratico, D., Pace-Asciak, C., Drion, P., Pirotte, B., Ruan, K.-H. (2006). From the Design to the Clinical Application of Thromboxane Modulators. *Current Pharmaceutical Design*, 12(8), 903–923.
- Dos Santos, M., Crousse, B., Bonnet-Delpon, D. (2008). Barbier conditions for reformatsky and alkylation reactions on trifluoromethyl aldimines. *Synlett*, (3), 399–401.
- Du, P., Hu, T., An, Z., Li, P., Liu, L. (2020). Simultaneous quantitative determination of arachidonic acid and cascade metabolites in rat serum by UPLC-MS/MS: application for longitudinal metabolomics of anlotinib. *Analyst*, 145(14), 4972–4981.
- During, A., Larondelle, Y. (2013). The O-methylation of chrysin markedly improves its intestinal anti-inflammatory properties: Structure-activity relationships of flavones. *Biochemical Pharmacology*, 86(12), 1739–1746.
- Erovic, B. M., Woegerbauer, M., Pammer, J., Selzer, E., Grasl, M. C., Thurnher, D. (2008). Strong evidence for up-regulation of cyclooxygenase1 in head and neck cancer. *European journal of clinical investigation*, 38(1), 61-66
- Fakhrudin, N., Dwi Astuti, E., Sulistyawati, R., Santosa, D., Susandarini, R., Nurrochmad, A., Wahyuono, S. (2017). n-Hexane insoluble fraction of *Plantago lanceolata* exerts anti-inflammatory activity in mice by inhibiting cyclooxygenase-2 and reducing chemokines levels. *Scientia pharmaceutica*, 85(1), 12.
- Farahpour, M. R., Amniattalab, A., Ismayil Najad, H.. (2012). Histological evaluation of *Plantago lanceolata* L. extract in accelerating wound healing. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(34), 4844-4847.
- Fayera, S., Babu G, N., Dekebo, A., Bogale, Y. (2018). Phytochemical investigation and antimicrobial study of leaf extract of *Plantago lanceolata*. *Natural Products Chemistry Research*, 06(02).
- Féléto, M., Huang, Y., Vanhoutte, P. M. (2011). Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *British journal of pharmacology*, 164(3), 894–912.
- Ferk, F., Chakraborty, A., Simic, T., Kundi, M., Knasmüller, S. (2007). Antioxidant and free radical scavenging activities of sumac (*Rhus coriaria*) and identification of gallic acid as its active principle. *BMC Pharmacology*, 7(S2), A71.
- Ferrazzano, G. F., Cantile, T., Roberto, L., Ingenito, A., Catania, M. R., Roscetto, E., Palumb, G., Zarrelli, A., Pollio, A. (2015). Determination of the in vitro and in vivo antimicrobial activity on salivary streptococci and lactobacilli and chemical characterisation of the phenolic content of a *Plantago lanceolata* infusion. *BioMed Research International*, 2015.286817.
- Filkin, S. Y., Lipkin, A. V., Fedorov, A. N. (2020). Phospholipase Superfamily: Structure, Functions, and Biotechnological Applications. *Biochemistry (Moscow)*, 85, 177–195.
- Finimundy, T. C., Barros, L., Calhelha, R. C., Alves, M. J., Prieto, M. A., Abreu, R. M. V., Dillon, A.J.P., Henriques, J.A.P., Roesch-Ely, M., Ferreira, I. C. F. R. (2018). Multifunctions of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer: A highly nutritious food and a source for bioactive compounds. *Food Chemistry*, 245(January), 150–158.
- Fleer, H., Verspohl, E. J. (2007). Antispasmodic activity of an extract from *Plantago lanceolata* L. and some isolated compounds. *Phytomedicine*, 14(6), 409-415.
- Fragopoulou, E., Antonopoulou, S. (2020). The French paradox three decades later: Role of inflammation and thrombosis. *Clinica Chimica Acta*, 510(November 2019), 160–169.
- Fragopoulou, E., Petsini, F., Choleva, M., Detopoulou, M., S Arvaniti, O., Kallinikou, E., Sakantani, E., Tsolou, A., Tzortzis, N., Samaras, Y. (2020). Evaluation of anti-inflammatory, anti-platelet and anti-oxidant activity of wine extracts prepared from ten different grape varieties. *Molecules*, 25(21), 5054.
- Fons, F., Gargadennec, A., Rapior, S. (2008) Culture of *Plantago* species as bioactive components resources: a 20-year review and recent applications. *Acta Botanica Gallica*, 155(2), 277-300.
- Frohberg, P., Drutkowski, G., Wobst, I. (2006). Monitoring eicosanoid biosynthesis via lipoxygenase and cyclooxygenase pathways in human whole blood by single HPLC run. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41(4), 1317-1324.

- Gabrielsen, A., Qiu, H., Bäck, M., Hamberg, M., Hemdahl, A. L., Agardh, H., Folkersen, L., Swedenborg, J., Hedin, U., Paulsson-Berne, G., Haeggstrom, J.Z., Hansson, G. K. (2010). Thromboxane synthase expression and thromboxane A₂ production in the atherosclerotic lesion. *Journal of molecular medicine*, 88(8), 795-806.
- Galvez, M., Martín-Cordero, C., Lopez-Lazaro, M., Cortes, F., & Ayuso, M. J. (2003). Cytotoxic effect of *Plantago* spp. on cancer cell lines. *Journal of ethnopharmacology*, 88(2-3), 125-130.
- Galvez, M., Martín-Cordero, C., Houghton, P. J., Ayuso, M. J. (2005). Antioxidant activity of methanol extracts obtained from *Plantago* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1927–1933.
- García-Mediavilla, V., Crespo, I., Collado, P. S., Esteller, A., Sánchez-Campos, S., Tuñón, M. J., González-Gallego, J. (2007). The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *European Journal of Pharmacology*, 557(2-3), 221–229.
- Garrelds, I. M., van Hal, P. T., Haakmat, R. C., Hoogsteden, H. C., Saxena, P. R., Zijlstra, F. J. (1999). Time dependent production of cytokines and eicosanoids by human monocytic leukaemia U937 cells; effects of glucocorticosteroids. *Mediators of Inflammation*, 8(4–5), 229–235.
- Garrido, J., Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols - A chemical perspective. *Food Research International*, 54(2), 1844–1858.
- Genc, Y., Harput, U. S., Saracoglu, I. (2019). Active compounds isolated from *Plantago subulata* L. via wound healing and antiinflammatory activity guided studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 241, 112030.
- Genc, Y., Dereli, F. T. G., Saracoglu, I., Akkol, E. K. (2020)a. The inhibitory effects of isolated constituents from *Plantago major* subsp. major L. on collagenase, elastase and hyaluronidase enzymes: Potential wound healer. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 28(1), 101–106.
- Genc, Y., Sohretoglu, D., Harput, U. S., Ishiuchi, K., Makino, T., Saracoglu, I. (2020)b. Chemical Constituents of *Plantago holosteum* and Evaluation of their Chemotaxonomic Significance. *Chemistry of Natural Compounds*, 56(3), 566–568.
- Ginjom, I. R., Dapos;Arcy, B. R., Caffin, N. A., Gidley, M. J. (2010). Phenolic contents and antioxidant activities of major australian red wines throughout the winemaking process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(18), 10133–10142.
- Goedken, E. R., Gagnon, A. I., Overmeyer, G. T., Liu, J., Petrillo, R. A., Burchat, A. F., Tomlinson, M. J. (2008). HTRF-based assay for microsomal prostaglandin E₂ synthase-1 activity. *Journal of Biomolecular Screening*, 13(7), 619–625.
- Goldenberg, M. M. (1999). Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clinical therapeutics*, 21(9), 1497-1513.
- Gonçalves, S., Romano, A. (2016). The medicinal potential of plants from the genus *Plantago* (Plantaginaceae). *Industrial Crops and Products*, 83, 213-226.
- Gonda, S., Nguyen, N. M., Batta, G., Gyémánt, G., Máthé, C., Vasas, G. (2013). Determination of phenylethanoid glycosides and iridoid glycosides from therapeutically used *Plantago* species by CE-MEKC. *Electrophoresis*, 34(17), 2577–2584.
- González-Barreiro, C., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B., & Simal-Gándara, J. (2015). Wine aroma compounds in grapes: a critical review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(2), 202-218.
- Granato, D., Chizuko, F., Katayama, U., Castro, I. A. De. (2011). Phenolic composition of South American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price and sensory quality. *Food Chemistry*, 129(2), 366–373.
- Grigore, A., Bubueanu, C., Pirvu, L., Ionita, L., Toba, G. (2015). *Plantago lanceolata* L. Crops—source of valuable raw material for various industrial applications. *Scientific Papers-Series A Agronomy*, 58, 207-214.
- Gris, E. F., Mattivi, F., Ferreira, E. A., Vrhovsek, U., Filho, D. W., Pedrosa, R. C., Bordignon-Luiz, M. T. (2013). Phenolic profile and effect of regular consumption of Brazilian red wines on *in vivo* antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31(1), 31–40
- Gris, E. F., Mattivi, F., Ferreira, E. A., Vrhovsek, U., Pedrosa, R. C., Bordignon-Luiz, M. T. (2011). Proanthocyanidin profile and antioxidant capacity of Brazilian *Vitis vinifera* red wines. *Food Chemistry*, 126(1), 213–220.

- Guerrero, J. A., Lozano, M. L., Castillo, J., Benavente-García, O., Vicente, V., Rivera, J. (2005). Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A₂ receptor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(2), 369–376.
- Guglielmone, H. A., Agnese, A. M., Núñez Montoya, S. C., Cabrera, J. L. (2005). Inhibitory effects of sulphated flavonoids isolated from *Flaveria bidentis* on platelet aggregation. *Thrombosis Research*, 115(6), 495–502.
- Guilford, J. M., & Pezzuto, J. M. (2011). Wine and health: A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62(4), 471-486
- Gupta, R. A., Tejada, L. V., Tong, B. J., Das, S. K., Morrow, J. D., Dey, S. K., DuBois, R. N. (2003). Cyclooxygenase-1 is overexpressed and promotes angiogenic growth factor production in ovarian cancer. *Cancer research*, 63(5), 906-911.
- Haddadian, K., Haddadian, K., Zahmatkash, M. (2014). A review of *Plantago* plant. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 13 (4), 681–685.
- Hämäläinen, M., Nieminen, R., Asmawi, M. Z., Vuorela, P., Vapaatalo, H., Moilanen, E. (2011). Effects of flavonoids on prostaglandin E₂ production and on COX-2 and mPGES-1 expressions in activated macrophages. *Planta medica*, 77(13), 1504-1511.
- Handjieva, N., Saadi, H., Evstatieva, L. (1991). Iridoid Glucosides from *Plantago altissima* L., *Plantago lanceolata* L., *Plantago atrata* Hoppe and *Plantago argentea* Chaix. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 46(9-10), 963-965.
- Hanekamp, W., Lehr, M. (2012). Determination of arachidonic acid by on-line solid-phase extraction HPLC with UV detection for screening of cytosolic phospholipase A₂α inhibitors. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 900, 79–84.
- Hara, S., Kamei, D., Sasaki, Y., Tanemoto, A., Nakatani, Y., Murakami, M. (2010). Prostaglandin E synthases: Understanding their pathophysiological roles through mouse genetic models. *Biochimie*, 92(6), 651–659.
- Harizi, H., Corcuff, J. B., Gualde, N. (2008). Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends in molecular medicine*, 14(10), 461-469.
- Haseeb, A., Chen, D., Haqqi, T. M. (2013). Delphinidin inhibits IL-1β-induced activation of NF-κB by modulating the phosphorylation of IRAK-1Ser376 in human articular chondrocytes. *Rheumatology (United Kingdom)*, 52(6), 998–1008.
- Hassemer, G., Meudt, H. M., Rønsted, N. (2017). Nomenclatural and taxonomic notes on Mediterranean narrow-leaved plantains (*Plantago* section Maritima, *Plantaginaceae*). *Webbia*, 72(2), 197–205.
- Hausmann, M., Obermeier, F., Paper, D. H., Balan, K., Dunger, N., Menzel, K., Falk, W., Schoelmerich, J., Herfarth, H., Rogler, G. (2007). *In vivo* treatment with the herbal phenylethanoid acteoside ameliorates intestinal inflammation in dextran sulphate sodium-induced colitis. *Clinical Experimental Immunology*, 148(2), 373-381.
- He, F., Mu, L., Yan, G. L., Liang, N. N., Pan, Q. H., Wang, J., Reeves, M.J., Duan, C. Q. (2010). Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecules*, 15(12), 9057–9091.
- He, Y., Xia, Z., Yu, D., Wang, J., Jin, L., Huang, D., Ye, X., Li, X., Zhang, B. (2019). Hepatoprotective effects and structure-activity relationship of five flavonoids against lipopolysaccharide/D-galactosamine induced acute liver failure in mice. *International Immunopharmacology*, 68, 171–178.
- Heimler, D., Isolani, L., Vignolini, P., Tombelli, S., Romani, A. (2007). Polyphenol content and antioxidative activity in some species of freshly consumed salads. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5), 1724-1729.
- Higgins, L. M., Llanos, E. (2015). A healthy indulgence? Wine consumers and the health benefits of wine. *Wine Economics and Policy*, 4(1), 3–11.
- Hirano, T., Higa, S., Arimitsu, J., Naka, T., Ogata, A., Shima, Y., Fujimoto, M., Yamadori, T., Kuwabara, Y., Kawai, M., Matsuda, H., Yoshikawa, M., Maezaki, N., Tanaka, T., Kawase, I., Tanaka, T. (2006). Luteolin, a flavonoid, inhibits AP-1 activation by basophils. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340(1), 1–7.
- Hirata, A., Murakami, Y., Shoji, M., Kadoma, Y., Fujisawa, S. (2005). Kinetics of radical-scavenging activity of hesperetin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 expression. *Anticancer research*, 25(5), 3367-3374.

- Holetz, F. B., Pessini, G. L., Sanches, N. R., Cortez, D. A. G., Nakamura, C. V., Dias Filho, B. P. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(7), 1027-1031
- Hou, D.-X., Yanagita, T., Uto, T., Masuzaki, S., Fujii, M. (2005). Anthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2 expression in LPS-evoked macrophages: structure-activity relationship and molecular mechanisms involved. *Biochemical Pharmacology*, 70(3), 417-25.
- Hsiang, C. Y., Hseu, Y. C., Chang, Y. C., Kumar, K. J. S., Ho, T. Y., Yang, H. L. (2013). *Toona sinensis* and its major bioactive compound gallic acid inhibit LPS-induced inflammation in nuclear factor- κ B transgenic mice as evaluated by *in vivo* bioluminescence imaging. *Food Chemistry*, 136(2), 426-434.
- Hu, W., Wang, X., Wu, L., Shen, T., Ji, L., Zhao, X., Si, C.L., Jiang, Y., Wang, G. (2016). Apigenin-7-O- β -d-glucuronide inhibits LPS-induced inflammation through the inactivation of AP-1 and MAPK signaling pathways in RAW 264.7 macrophages and protects mice against endotoxin shock. *Food and Function*, 7(2), 1002-1013.
- Hussan, F., Basah, R. H. O., Yusof, M. R. M., Kamaruddin, N. A., Othman, F. (2015)a. *Plantago major* treatment enhanced innate antioxidant activity in experimental acetaminophen toxicity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(9), 728-732.
- Hussan, F., Mansor, A. S., Hassan, S. N., Kamaruddin, T. N. E., Tasnim, T. N., Budin, S. B., Othman, F. (2015)b. Anti-inflammatory property of *Plantago major* leaf extract reduces the inflammatory reaction in experimental acetaminophen-induced liver injury. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 347861.
- Hwang, D., Byrne, J., Scollard, D., & Levine, E. (1998). Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 90(6), 455-460.
- Ikeda, Y., Sugawara, A., Taniyama, Y., Uruno, A., Igarashi, K., Arima, S., Ito, S., Takeuchi, K. (2000). Suppression of rat thromboxane synthase gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor γ in macrophages via an interaction with NRF2. *Journal of Biological Chemistry*, 275(42), 33142-33150.
- Italiani, P., Boraschi, D. (2014). From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. *Frontiers in Immunology*, 5, 514.
- Ivanov, V., Cha, J., Ivanova, S., Kalinovskiy, T., Roomi, M. W., Rath, M., Niedzwiecki, A. (2008). Essential nutrients suppress inflammation by modulating key inflammatory gene expression. *International journal of molecular medicine*, 22(6), 731-741.
- Ivanova, D., Gerova, D., Chervenkov, T., Yankova, T. (2005). *Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants*, 96(August 2004), 145-150.
- Ivanova-Petropulos, V., Hermosín-Gutiérrez, I., Boros, B., Stefova, M., Stafilov, T., Vojnoski, B., Dörnyei, A., Kilár, F. (2015)a. Phenolic compounds and antioxidant activity of Macedonian red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 41, 1-14.
- Ivanova-petropulos, V., Ricci, A., Nedelkovski, D., Dimovska, V. (2015)b. Targeted analysis of bioactive phenolic compounds and antioxidant activity of Macedonian red wines. *Food Chemistry*, 171, 412-420.
- Janković, T., Menković, N., Zdunić, G., Beara, I., Balog, K., Šavikin, K., Mimica-Dukić, N. (2010). Quantitative determination of aucubin in seven *Plantago* species using HPLC, HPTLC, and LC-ESI-MS methods. *Analytical letters*, 43(16), 2487-2495.
- Janković, T., Zdunić, G., Beara, I., Balog, K., Pljevljakušić, D., Stešević, D., Šavikin, K. (2012). Comparative study of some polyphenols in *Plantago* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 42, 69-74.
- Josifović, M. (ed.) Flora SR Srbije, SANU, Beograd, Srbija.
- Ji, X., Hou, C., Guo, X. (2019). Physicochemical properties, structures, bioactivities and future prospective for polysaccharides from *Plantago* L. (*Plantaginaceae*): A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 637-646.
- Jiang, Y. J., Lu, B., Choy, P. C., Hatch, G. M. (2003)a. Regulation of cytosolic phospholipase A2, cyclooxygenase-1 and-2 expression by PMA, TNF α , LPS and M-CSF in human monocytes and macrophages. In *Vascular Biochemistry* (pp. 31-38). Springer US.
- Jiang, Y. J., Xu, T. R., Lu, B., Mymin, D., Kroeger, E. A., Dembinski, T., Yang, X., Hatch, G.M., Choy, P. C. (2003)b. Cyclooxygenase expression is elevated in retinoic acid-differentiated U937 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1633(1), 51-60.
- Joo, M., Sadikot, R. T. (2012). PGD synthase and PGD 2 in immune response. *Mediators of Inflammation*, 2012. 503128.

- Jung, H. Y., Seo, D. W., Hong, C. O., Kim, J. Y., Yang, S. Y., Lee, K. W. (2015). Nephroprotection of plantamajoside in rats treated with cadmium. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39(1), 125–136.
- Jurišić Grubešić, R., Srećnik, G., Kremer, D., Vuković Rodríguez, J., Nikolić, T., Vladimir-Knežević, S. (2013). Simultaneous RP-HPLC-DAD separation, and determination of flavonoids and phenolic acids in *Plantago* L. species. *Chemistry & biodiversity*, 10(7), 1305-1316.
- Jurišić, R., Debeljak, Ž., Vladimir-Knežević, S., Vuković, J. (2004). Determination of aucubin and catalpol in *Plantago* species by micellar electrokinetic chromatography. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59(1-2), 27-31.
- Kahlon, D. K., Lansdell, T. A., Fisk, J. S., Hupp, C. D., Friebe, T. L., Hovde, S., Jones, A.D., Dyer, R.D., Henty, R.W., Tepe, J. J. (2009). Nuclear factor- κ B mediated inhibition of cytokine production by imidazoline scaffolds. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(5), 1302–1309.
- Kajita, S., Ruebel, K. H., Casey, M. B., Nakamura, N., Lloyd, R. V. (2005). Role of COX-2, thromboxane A2 synthase, and prostaglandin I 2 synthase in papillary thyroid carcinoma growth. *Modern Pathology*, 18(2), 221–227.
- Kang, H. K., Ecklund, D., Liu, M., Datta, S. K. (2009)a. Apigenin, a non-mutagenic dietary flavonoid, suppresses lupus by inhibiting autoantigen presentation for expansion of autoreactive Th1 and Th17 cells. *Arthritis research therapy*, 11(2), 1-13.
- Kang, N. J., Lee, K. W., Shin, B. J., Jung, S. K., Hwang, M. K., Bode, A. M., Dong, Z. (2009)b. Caffeic acid, a phenolic phytochemical in coffee, directly inhibits Fyn kinase activity and UVB-induced COX-2 expression. *Carcinogenesis*, 30 (2), 321-330.
- Kang, Y. J., Mbonye, U. R., DeLong, C. J., Wada, M., Smith, W. L. (2007). Regulation of intracellular cyclooxygenase levels by gene transcription and protein degradation. *Progress in lipid research*, 46(2), 108-125.
- Karličková, J., Říha, M., Filipický, T., Macáková, K., Hrdina, R., Mladěnka, P. (2015). Antiplatelet effects of flavonoids mediated by inhibition of arachidonic acid based pathway. *Planta Medica*, 82(1–2), 76–83.
- Karlmark, K., Tacke, F., Dunay, I. (2012). Monocytes in health and disease — Minireview. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 2(2), 97–102.
- Karlsen, A., Retterstøl, L., Laake, P., Kjølrsrud-Bøhn, S., Sandvik, L., Blomhoff, R. (2007). Effects of a daily intake of one glass of red wine on biomarkers of antioxidant status, oxidative stress and inflammation in healthy adults. *E-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism*, 2(6), 127–133.
- Karlsson, S., Nånberg, E., Fjaeraa, C., Wijkander, J. (2010). Ellagic acid inhibits lipopolysaccharide-induced expression of enzymes involved in the synthesis of prostaglandin E₂ in human monocytes. *British journal of nutrition*, 103(08), 1102-1109.
- Kartini, Piyaviriyakul, S., Siripong, P., Vallisuta, O. (2014). HPTLC simultaneous quantification of triterpene acids for quality control of *Plantago major* L. and evaluation of their cytotoxic and antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, 60, 239-246.
- Kartini, S. P., Thongpraditchote, S., Siripong, P., Vallisuta, O. (2017). Effects of *Plantago major* extracts and its chemical compounds on proliferation of cancer cells and cytokines production of lipopolysaccharide-activated THP-1 macrophages. *Pharmacognosy magazine*, 13(51), 393.
- Kato, M., Nishida, S., Kitasato, H., Sakata, N., Kawai, S. (2001). Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: investigation using human peripheral monocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(12), 1679–1685.
- Kats, A., Båge, T., Georgsson, P., Jönsson, J., Quezada, H. C., Gustafsson, A., Jansson, L., Lindberg, C., Nasström, K., Yucel-Lindberg, T. (2013). Inhibition of microsomal prostaglandin E synthase-1 by aminothiazoles decreases prostaglandin E₂ synthesis *in vitro* and ameliorates experimental periodontitis *in vivo*. *The FASEB Journal*, 27(6), 2328-2341.
- Kawashty, S. A., Abdalla, M. F., Saleh, N. A. M. (1994). Flavonoids of *Plantago* species in Egypt. *Biochemical Systematics and Ecology*, 22(7), 729-733.
- Kim, H. P., Pham, H. T., Ziboh, V. A. (2001). Flavonoids differentially inhibit guinea pig epidermal cytosolic phospholipase A₂. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 65(5–6), 281–286.
- Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W., Kang, S. S. (2004). Critical Review Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*, 96, 229 – 245.

- Klockars, G. K., Bowers, M. D., Cooney, B. (1993). Leaf variation in iridoid glycoside content of *Plantago lanceolata* (*Plantaginaceae*) and oviposition of the buckeye , *Junonia coenia* (*Nymphalidae*). 78, 72–78.
- Knights, K. M., Mangoni, A. A., Miners, J. O. (2010). Defining the COX inhibitor selectivity of NSAIDs: implications for understanding toxicity. *Expert review of clinical pharmacology*, 3(6), 769-776.
- Kobeasy, I., Abdel-Fatah, M., Abd El-Salam, S. M., Mohamed, Z. E. O. M. (2011). Biochemical studies on *Plantago major* L. and *Cyamopsis tetragonoloba* L. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 3(3), 83-91.
- Koerberle, A., Werz, O. (2018). Natural products as inhibitors of prostaglandin E₂ and pro-inflammatory 5-lipoxygenase-derived lipid mediator biosynthesis. *Biotechnology advances*, 36(6), 1709-1723
- Koerberle, A., Bauer, J., Verhoff, M., Hoffmann, M., Northoff, H., Werz, O. (2009)a. Green tea epigallocatechin-3-gallate inhibits microsomal prostaglandin E₂ synthase-1. *Biochemical and biophysical research communications*, 388(2), 350-354.
- Koerberle, A., Laufer, S. A., Werz, O. (2016). Design and Development of Microsomal Prostaglandin E₂ Synthase-1 Inhibitors: Challenges and Future Directions. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(13), 5970–5986.
- Koerberle, A., Northoff, H., Werz, O. (2009)c. Identification of 5-lipoxygenase and microsomal prostaglandin E₂ synthase-1 as functional targets of the anti-inflammatory and anti-carcinogenic garcinol. *Biochemical Pharmacology*, 77(9), 1513–1521.
- Koerberle, A., Northoff, H., Werz, O. (2009)b. Curcumin blocks prostaglandin E₂ biosynthesis through direct inhibition of the microsomal prostaglandin E₂ synthase-1. *Molecular cancer therapeutics*, 8(8), 2348-2355.
- Koerberle, A., Rossi, A., Bauer, J., Dehm, F., Verotta, L., Northoff, H., Werz, O. (2011). Hyperforin, an anti-inflammatory constituent from St. John's Wort, inhibits microsomal prostaglandin E₂ Synthase-1 and suppresses prostaglandin E₂ formation *in vivo*. *Frontiers in pharmacology*, 2,7.
- Koerberle, A., Siemoneit, U., Bühring, U., Northoff, H., Laufer, S., Albrecht, W., Werz, O. (2008). Licofelone suppresses prostaglandin E₂ formation by interference with the inducible microsomal prostaglandin E₂ synthase-1. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 326(3), 975–982.
- Koerberle, A., Werz, O. (2015). Perspective of microsomal prostaglandin E₂ synthase-1 as drug target in inflammation-related disorders. *Biochemical Pharmacology*. 98(1), 1-15
- Kokotou, M. G., Galiatsatou, G., Magrioti, V., Koutoulogenis, G., Barbayianni, E., Limnios, D., Mouchlis, V. D., Navratil, A., Dennis, E. A., Kokotos, G. (2017). 2-Oxoesters: A Novel Class of Potent and Selective Inhibitors of Cytosolic Group IVA Phospholipase A₂. *Scientific Reports*, 7(1), 1–16. b
- Kokotou, M. G., Limnios, D., Nikolaou, A., Psarra, A., Kokotos, G. (2017). Inhibitors of phospholipase A₂ and their therapeutic potential: an update on patents (2012-2016). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 27(2), 217–225.
- Kolak, U., Boga, M., Urusak, E. A., Ulubelen, A. (2011). Constituents of *Plantago major* subsp. *intermedia* with antioxidant and anticholinesterase capacities. *Turkish Journal of Chemistry*, 35(4), 637-645.
- Kontogiorgis, C., Hadjipavlou-Litina, D. (2010). Thromboxane Synthase Inhibitors and Thromboxane A₂ Receptor Antagonists: A Quantitative Structure Activity Relationships (QSARs) Analysis. *Current Medicinal Chemistry*, 17(28), 3162–3214.
- Korbecki, J., Baranowska-Bosiacka, I., Gutowska, I., Chlubek, D. (2014). Cyclooxygenase pathways. *Acta Biochimica Polonica*, 61(4), 639-649.
- Ku, S. K., Lee, H. G., Bae, J. S. (2015). Inhibitory effect of baicalin, baicalein and wogonin on secretory group IIA phospholipase A₂. *Archives of Pharmacal Research*, 38(10), 1865–1872.
- Kumar, N., Pruthi, V. (2015). Structural elucidation and molecular docking of ferulic acid from *Parthenium hysterophorus* possessing COX-2 inhibition activity. *3 Biotech*, 5(4), 541–551.
- Kundu, J. K., Na, H. K., Chun, K. S., Kim, Y. K., Lee, S. J., Lee, S. S., Surh, Y. J. (2003). Inhibition of phorbol ester–induced COX-2 expression by epigallocatechin gallate in mouse skin and human Mammary epithelial cells. *The Journal of nutrition*, 133(11), 3805S-3810S.
- Kuno, S., Srinoun, K., Penglong, T. (2020). The effects of phorbol 12-myristate 13-acetate concentration on the expression of miR-155 and miR-125b and their macrophage function-related genes in the U937 cell line. *Journal of Toxicological Sciences*, 45(12), 751–761.

- Kuroda, A., Sugiyama, E., Taki, H., Mino, T., Kobayashi, M. (1997). Interleukin-4 inhibits the gene expression and biosynthesis of cytosolic phospholipase A₂ in lipopolysaccharide stimulated U937 macrophage cell line and freshly prepared adherent rheumatoid synovial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 230(1), 40-43.
- Kurumbail, R. G., Stevens, A. M., Gierse, J. K., McDonald, J. J., Stegeman, R. A., Pak, J. Y., Isakson, P. C. (1996). Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, 384(6610), 644-648.
- Kutil, Z., Temml, V., Maghradze, D., Pribylova, M., Dvorakova, M., Schuster, D., Vanek, T., Landa, P. (2014). Impact of wines and wine constituents on cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2, and 5-lipoxygenase catalytic activity. *Mediators of Inflammation*, 2014, 178931.
- Larsson, K., Steinmetz, J., Bergqvist, F., Arefin, S., Spahiu, L., Wannberg, J., Pawelzik, s.C., Morgenstern, R., Stenberg, P., Kublickiene, K., Korotkova, M., Jakobsson, P. J. (2019). Biological characterization of new inhibitors of microsomal PGE synthase-1 in preclinical models of inflammation and vascular tone. *British Journal of Pharmacology*, 176(24), 4625-4638.
- Lättig, J., Böhl, M., Fischer, P., Tischer, S., Tietböhl, C., Menschikowski, M., Gutzeit, H.O., Metz, P., Pisabarro, M. T. (2007). Mechanism of inhibition of human secretory phospholipase A₂ by flavonoids: rationale for lead design. *Journal of computer-aided molecular design*, 21(8), 473-483.
- Laufer, S., Greim, C., Luik, S., Ayoub, S. S., Dehner, F. (2008). Human whole blood assay for rapid and routine testing of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on cyclo-oxygenase-2 activity. *Inflammopharmacology*, 16(4), 155-161.
- Laufer, S., Zechmeister, P., Klein, T. (1999). Development of an *in-vitro* test system for the evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Inflammation research*, 48(3), 133-138.
- Leclerc, P., Idborg, H., Spahiu, L., Larsson, C., Nekhotiaeva, N., Wannberg, J., Stenberg, P., Korotkova, M., Jakobsson, P. J. (2013). Characterization of a human and murine mPGES-1 inhibitor and comparison to mPGES-1 genetic deletion in mouse models of inflammation. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 107, 26-34.
- Lee, T. P., Matteliano, M. L., Middleton Jr, E. (1982). Effect of quercetin on human polymorphonuclear leukocyte lysosomal enzyme release and phospholipid metabolism. *Life sciences*, 31(24), 2765-2774.
- Lee, D. H., Cho, H. J., Kang, H. Y., Rhee, M. H., Park, H. J. (2012). Total saponin from Korean Red Ginseng inhibits thromboxane A₂ production associated microsomal enzyme activity in platelets. *Journal of ginseng research*, 36(1), 40-46.
- Lee, D. H., Kim, Y. J., Kim, H. H., Cho, H. J., Ryu, J. H., Rhee, M. H., Park, H. J. (2013). Inhibitory effects of epigallocatechin-3-gallate on microsomal cyclooxygenase-1 activity in platelets. *Biomolecules and Therapeutics*, 21(1), 54-59.
- Lee, I. C., Bae, J. S. (2015). Inhibitory effect of vicenin-2 and scolymoside on secretory group IIA phospholipase A₂. *Animal Cells and Systems*, 19(5), 305-311.
- Lee, J., Durst, R. W., Wrolstad, R. E., Collaborators: Eisele T Giusti MM Hach J Hofsommer H Koswig S Krueger DA Kupina; S Martin SK Martinsen BK Miller TC Paquette F Ryabkova A Skrede G Trenn U Wightman JD. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC international*, 88(5), 1269-1278.
- Lee, K. Y. (2019). M1 and M2 polarization of macrophages: a mini-review. *Medical Biological Science and Engineering*, 2(1), 1-5.
- Legler, D. F., Bruckner, M., Uetz-von Allmen, E., Krause, P. (2010). Prostaglandin E₂ at new glance: Novel insights in functional diversity offer therapeutic chances. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 42(2), 198-201.
- Lescano, C. H., de Lima, F. F., Mendes-Silvério, C. B., Justo, A. F. O., Baldivia, D. da S., Vieira, C. P., Sanjinez-Argandoña, E.J., Cardoso, C.A.L., Monica, F., de Oliveira, I. P. (2018). Effect of polyphenols from *Campomanesia adamantium* on platelet aggregation and inhibition of cyclooxygenases: Molecular docking and *in vitro* analysis. *Frontiers in Pharmacology*, 9 (JUN), 617.
- Lesjak, M. M., Beara, I. N., Orčić, D. Z., Ristić, J. D., Anačkov, G. T., Božin, B. N., Mimica-Dukić, N. M. (2013). Chemical characterisation and biological effects of *Juniperus foetidissima* Willd. 1806. *LWT - Food Science and Technology*, 53(2), 530-539.
- Lesjak, M., Beara, I., Simin, N., Pintać, D., Majkić, T., Bekvalac, K., Orčić, D., Mimica-Dukić, N. (2018). Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. *Journal of Functional Foods*, 40 (November 2017), 68-75.

- Leslie, C. C. (2015). Cytosolic phospholipase A₂: Physiological function and role in disease. *Journal of Lipid Research*, 56(8), 1386–1402.
- Leveridge, M. V., Bardera, A. I., Lamarr, W., Billinton, A., Bellenie, B., Edge, C., Francis, P., Christodoulou, E., Shillings, A., Hibbs, M., Fosberry, A., Tanner, R., Hardwicke, P., Craggs, P., Sinha, Y., Elegbe, O., Alvarez-Ruiz, E., Martin-Plaza, J.J., Barroso-Poveda, V., Baddeley, S., Chung, C.W., Hutchinson, J. (2012). Lead discovery for microsomal prostaglandin synthase using a combination of high-throughput fluorescent-based assays and RapidFire mass spectrometry. *Journal of Biomolecular Screening*, 17(5), 641–650.
- Li, H., Lee, M.-H., Liu, K., Wang, T., Song, M., Han, Y., Yao, K., Xie, H., Zhu, F., Grossmann, M., Clear, M.P., Chen, W., Bode, A.M. Dong, Z. (2017). Inhibiting breast cancer by targeting the thromboxane A₂ pathway. *Npj Precision Oncology*, 1(1), 1–7.
- Lianos, E. A. (1999). Eicosanoid protocols (Vol. 120). Springer Science Business Media.
- Lim, H., Park, H., Kim, H. P. (2011). Effects of Flavonoids on Matrix Metalloproteinase-13 Expression of Interleukin-1 β -Treated Articular Chondrocytes and Their Cellular Mechanisms: Inhibition of c-Fos/AP-1 and JAK/STAT Signaling Pathways. *Journal of Pharmacological Sciences*, 116(2), 221–231.
- Lin, N., Sato, T., Takayama, Y., Mimaki, Y., Sashida, Y., Yano, M., Ito, A. (2003). Novel anti-inflammatory actions of nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, on human synovial fibroblasts and mouse macrophages. *Biochemical pharmacology*, 65(12), 2065-2071.
- Lindahl, M., Tagesson, C. (1997). Flavonoids as phospholipase A₂ inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A₂. *Inflammation*, 21(3), 347-356.
- Lingua, M. S., Fabani, M. P., Wunderlin, D. A., Baroni, M. V. (2016). From grape to wine : Changes in phenolic composition and its influence on antioxidant activity. *Food Chemistry*, 208, 228–238.
- Liu, C. M., Sun, Y. Z., Sun, J. M., Ma, J. Q., Cheng, C. (2012). Protective role of quercetin against lead-induced inflammatory response in rat kidney through the ROS-mediated MAPKs and NF- κ B pathway. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1820(10), 1693–1703.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- López-Rodríguez, R., Herrera-Ruiz, M., Trejo-Tapia, G., Domínguez-Mendoza, B. E., González-Cortazar, M., Zamilpa, A. (2019). *In vivo* gastroprotective and antidepressant effects of iridoids, verbascoside and tenuifloroside from castilleja tenuiflora benth. *Molecules*, 24(7), 1–13.
- La Torre, G. L., Saitta, M., Vilasi, F., Pellicanò, T., & Dugo, G. (2006). Direct determination of phenolic compounds in Sicilian wines by liquid chromatography with PDA and MS detection. *Food Chemistry*, 94(4), 640-650.
- Lotito, S. B., Zhang, W. J., Yang, C. S., Crozier, A., Frei, B. (2011). Metabolic conversion of dietary flavonoids alters their anti-inflammatory and antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(2), 454–463.
- Luceri, C., Giannini, L., Lodovici, M., Antonucci, E., Abbate, R., Masini, E., & Dolaro, P. (2007). p-Coumaric acid, a common dietary phenol, inhibits platelet activity *in vitro* and *in vivo*. *British Journal of Nutrition*, 97(3), 458-463
- Lukova, P., Karcheva-Bahchevanska, D., Dimitrova-Dyulgerova, I., Katsarov, P., Mladenov, R., Iliev, I., Nikolova, M. (2018). A comparative pharmacognostic study and assesment of antioxidant capacity of three species from *Plantago* genus. *Farmacia*, 66(4), 609–614.
- Mahat, M. Y. A., Kulkarni, N. M., Vishwakarma, S. L., Khan, F. R., Thippeswamy, B. S., Hebballi, V., Patil, B. M. (2010). Modulation of the cyclooxygenase pathway via inhibition of nitric oxide production contributes to the anti-inflammatory activity of kaempferol. *European Journal of Pharmacology*, 642(1-3), 169–176.
- Mahmood, A.A. and M.E. Phipps , 2006. Wound Healing Activities of *Plantago major* Leaf Extract in Rats. *International Journal of Tropical Medicine*, 1: 33-35.
- Maione, F., Cantone, V., Pace, S., Chini, M. G., Bisio, A., Romussi, G., Pieretti, S., Werz, O., Koeberle, A., Mascolo, N., Bifulco, G. (2016). *In vivo* and *in vitro* biological evaluation of the anti-inflammatory and analgesic response of carnosol and carnosic acid and *in silico* analysis of their target interactions. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1497-1508.
- Majkić, T. M., Torović, L. D., Lesjak, M. M., Četojević-Simin, D. D., Beara, I. N. (2019). Activity profiling of Serbian and some other European Merlot wines in inflammation and oxidation processes. *Food Research International*, 121, 151–160.

- Majkić, T., Bekvalac, K., Beara, I. (2020). Plantain (*Plantago* L.) species as modulators of prostaglandin E₂ and thromboxane A₂ production in inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 262, 113140.
- Mandour, Y., Handoussa, H., Swilam, N., Hanafi, R., Mahran, L. (2016). Structural Docking Studies of COX-II Inhibitory Activity for Metabolites Derived from *Corchorus olitorius* and *Vitis vinifera*. *International Journal of Food Properties*, 19(10), 2377–2384.
- Marchesan, M., Paper, D. H., Hose, S., & Franz, G. (1998). Investigation of the antiinflammatory activity of liquid extracts of *Plantago lanceolata* L. *Phytotherapy Research*, 12(S1), S33-S34.
- Marks, F., Fürstenberg, G. (ed.) (1999): Prostaglandins, leukotrienes and other eicosanoids: from biogenesis to clinical application. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Marnett, L. J. (2000). Cyclooxygenase mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4(5), 545–552.
- Márquez-Flores, Y. K., Villegas, I., Cárdeno, A., Rosillo, M. Á. (2016). Apigenin supplementation protects the development of dextran sulfate sodium- induced murine experimental colitis by inhibiting canonical and non-canonical inflammasome signaling pathways. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 30, 143–152.
- Massé, F., Guiral, S., Fortin, L. J., Cauchon, E., Ethier, D., Guay, J., Brideau, C. (2005). An automated multistep high-throughput screening assay for the identification of lead inhibitors of the inducible enzyme mPGES-1. *Journal of Biomolecular Screening*, 10(6), 599–605.
- Mauro, A., Lipari, L., Leone, A., Tortorici, S., Burruano, F., Provenzano, S., Gerbino, A., Buscemi, M. (2010). Expression of Cyclooxygenase-1 and Cyclooxygenase-2 in normal and pathological human oral mucosa. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 48(4), 555–563.
- Mbonye, U. R., Song, I. (2009). Posttranscriptional and posttranslational determinants of cyclooxygenase expression. *BMB Reports*, 42(9), 552–560.
- Mbonye, U. R., Wada, M., Rieke, C. J., Tang, H. Y., DeWitt, D. L., Smith, W. L. (2006): The 19-amino acid cassette of cyclooxygenase-2 mediates entry of the protein into the endoplasmic reticulum-associated degradation system. *Journal of Biological Chemistry*, 281(47), 35770-35778.
- Mello, J. C., Gonzalez, M. V., Moraes, V. W., Prieto, T., Nascimento, O. R., Rodrigues, T. (2015). Protective effect of *Plantago major* extract against t-BOOH-induced mitochondrial oxidative damage and cytotoxicity. *Molecules*, 20(10), 17747-17759.
- Mello, J. C., Guimarães, N. S., Gonzalez, M. V., Paiva, J. S., Prieto, T., Nascimento, O. R., Rodrigues, T. (2012). Hydroxyl scavenging activity accounts for differential antioxidant protection of *Plantago major* against oxidative toxicity in isolated rat liver mitochondria. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64(8), 1177-1187.
- Mello, P. D', Gadhwal, M. K., Joshi, U., Shetgiri, P. (2011). Modeling of COX-2 inhibitory activity of flavonoids. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(4), 33–40.
- Metiner, K., Ozkan, O., Ak, S. (2012). Antibacterial effects of ethanol and acetone extract of *Plantago major* L. on gram positive and gram negative bacteria. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 18(3), 503-505.
- Miljić, U., Puškaš, V., Cvejić Hogervorst, J., Torović, L. (2017). Phenolic compounds, chromatic characteristics and antiradical activity of plum wines. *International journal of food properties*, 20(sup2), 2022-2033.
- Mitić, M., Kostić, D., Pavlović, A. (2014). The phenolic composition and the antioxidant capacity of Serbian red wines. *Advanced technologies* . 3(1), 16–22.
- Mitjavila, M. T., Moreno, J. J. (2012). The effects of polyphenols on oxidative stress and the arachidonic acid cascade. Implications for the prevention/treatment of high prevalence diseases. *Biochemical Pharmacology*, 84(9), 1113–1122.
- Moon, C. H., Jung, Y. S., Kim, M. H., Lee, S. H., Baik, E. J., Park, S. W. (2000). Mechanism for antiplatelet effect of onion: AA release inhibition, thromboxane A₂ synthase inhibition and TXA₂/PGH₂ receptor blockade. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 62(5), 277-283.
- Moon, T. C., Quan, Z., Kim, J., Kim, H. P., Kudo, I., Murakami, M., Park, H., Chang, H. W. (2007). Inhibitory effect of synthetic C-C biflavones on various phospholipase A₂s activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15(22), 7138–7143.
- Moussa, O., Yordy, J. S., Abol-Enein, H., Sinha, D., Bissada, N. K., Halushka, P. V., Ghoneim, M.A., Watson, D. K. (2005). Prognostic and functional significance of thromboxane synthase gene overexpression in invasive bladder cancer. *Cancer Research*, 65(24), 11581–11587.

- Murai, M., Tamayama, Y., Nishibe, S. (1995). Phenylethanoids in the herb of *Plantago lanceolata* and inhibitory effect on arachidonic acid-induced mouse ear edema. *Planta medica*, 61(05), 479-480.
- Murakami M, Sato H, Taketomi Y (2020). Updating Phospholipase A₂ Biology. *Biomolecules*. 10(10):1457
- Murias, M., Handler, N., Erker, T., Pleban, K., Ecker, G., Saiko, P., Szekeres, T., Jäger, W. (2004). Resveratrol analogues as selective cyclooxygenase-2 inhibitors: Synthesis and structure-activity relationship. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 12(21), 5571–5578.
- Nakahata, N. (2008). Thromboxane A₂: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacology and Therapeutics*, 118(1), 18–35.
- Nakamura, Y., Fukami, K. (2017). Regulation and physiological functions of mammalian phospholipase C. *Journal of Biochemistry*, 161(4), 315–321.
- Nannoni, G., Volterrani, G., Mattarocci, A., Ali, A., Bertona, M., Emanuele, E. (2020)b. A proprietary herbal extract titred in verbascoside and aucubin suppresses lipopolysaccharide-stimulated expressions of cyclooxygenase-2 in human neutrophils. *Central European Journal of Immunology*, 45(2), 125–129.
- Nannoni, G., Volterrani, G., Mattarocci, A., Minoretta, P., Emanuele, E. (2020)a. Comparative efficacy and safety of Verbascox[®] – a proprietary herbal extract capable of inhibiting human cyclooxygenase-2 – and celecoxib for knee osteoarthritis. *Drug Discoveries Therapeutics*, 14(3), 129–134.
- Naraba, H., Murakami, M., Matsumoto, H., Shimbara, S., Ueno, A., Kudo, I., Oh-Ishi, S. (1998). Segregated coupling of phospholipases A₂, cyclooxygenases, and terminal prostanoid synthases in different phases of prostanoid biosynthesis in rat peritoneal macrophages. *The Journal of Immunology*, 160(6), 2974–2982.
- Nardini, M., Natella, F., Scaccini, C. (2007). Role of dietary polyphenols in platelet aggregation. A review of the supplementation studies. *Platelets*, 18(3), 224–243.
- Nataraj, A., Raghavendra Gowda, C., Rajesh, R., Vishwanath, B. (2007). Group IIA secretory PLA₂ inhibition by ursolic acid: A potent anti-inflammatory molecule. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 7(8), 801–809.
- Navarro-Núñez, L., Castillo, J., Lozano, M. L., Martínez, C., Benavente-García, O., Vicente, V., Rivera, J. (2009). Thromboxane A₂ receptor antagonism by flavonoids: Structure-activity relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1589–1594.
- Nelson, R. K., Frohman, M. A. (2015). Physiological and pathophysiological roles for phospholipase D. *Journal of Lipid Research*, 56(12), 2229–2237.
- Nhiem, N. X., Tai, B. H., Van Kiem, P., Van Minh, C., Cuong, N. X., Tung, N. H., Thu, V. K., Trung, T. N., Tuan Anh, H. L., Jo, S. H., Jang, H. D., Kwon, Y. I., Kim, Y. H. (2011). Inhibitory activity of *Plantago major* L. on angiotensin I-converting enzyme. *Archives of pharmacal research*, 34(3), 419-423.
- Nie, D., Che, M., Zacharek, A., Qiao, Y., Li, L., Li, X., Lamberti, M, Tang, K., Cai, Y., Guo, Y., Grignon, D., Honn, K. V. (2004). Differential Expression of Thromboxane Synthase in Prostate Carcinoma: Role in Tumor Cell Motility. *American Journal of Pathology*, 164(2), 429–439.
- Nikolaou, A., Kokotou, M. G., Vasilakaki, S., Kokotos, G. (2019). Small-molecule inhibitors as potential therapeutics and as tools to understand the role of phospholipases A₂. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864(6), 941–956.
- Noor, H., Juing, M., Chee, B. J., Kueh, B. L., Othman, Z. O. L. K. E. P. L. I. (2000). Medicinal properties of *Plantago major*: hypoglycaemic and male fertility studies. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 23(1), 29-35.
- Novo Belchor, M., Hessel Gaeta, H., Fabri Bittencourt Rodrigues, C., Ramos da Cruz Costa, C., de Oliveira Toyama, D., Domingues Passero, L. F., Laurenti, D., Hikari Toyama, M. (2017). Evaluation of rhamnetin as an Inhibitor of the pharmacological effect of secretory phospholipase A₂. *Molecules*, 22(9), 1–13.
- Nunes, C., Ferreira, E., Freitas, V., Almeida, L., Barbosa, R. M., Laranjinha, J. (2013). Intestinal anti-inflammatory activity of red wine extract: Unveiling the mechanisms in colonic epithelial cells. *Food and Function*, 4(3), 373–383.
- Nunes, C., Teixeira, N., Serra, D., Freitas, V., Almeida, L., Laranjinha, J. (2015). Red wine polyphenol extract efficiently protects intestinal epithelial cells from inflammation via opposite modulation of JAK/STAT and Nrf2 pathways. *Toxicology Research*, 5(1), 53–65.

- Núñez Guillén, M. E., da Silva Emim, J. A., Souccar, C., Lapa, A. J. (1997). Analgesic and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of *Plantago major* L. *International Journal of Pharmacognosy*, 35(2), 99-104.
- O'Hagan, D. (2010). Fluorine in health care: Organofluorine containing blockbuster drugs. *Journal of Fluorine Chemistry*, 131(11), 1071–1081.
- O'Leary, K. A., De Pascual-Tereasa, S., Needs, P. W., Bao, Y. P., O'Brien, N. M., Williamson, G. (2004). Effect of flavonoids and Vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 551(1-2), 245–254.
- Oi, N., Chen, H., Kim, M. O., Lubet, R. A., Bode, A. M., Dong, Z. (2012). Taxifolin suppresses UV-induced skin carcinogenesis by targeting EGFR and PI3K. *Cancer Prevention Research*, 5(9), 1103-1114.
- Olenikov, D. N., Mikhailova, T. M., Tankhaeva, L. M., Samuelsen, A. B. (2005). Organic acids of medicinal plants. 1. *Plantago major*. *Chemistry of natural compounds*, 41(4), 467-468
- Olenikov, D. N., Tankhaeva, L. M., Stolbikova, A. V., Petrov, E. V. (2011). Phenylpropanoids and polysaccharides from *Plantago depressa* and *P. media* growing in Buryatia. *Chemistry of Natural Compounds*, 47(2), 165-169.
- Ondua, M., Adebayo, S. A., Shai, L. J., Lebelo, S. L. (2016). The anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of some medicinal plant species used to treat inflammatory pain conditions in Southern Africa. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(10), 1571–1575.
- Orčić, D., Francišković, M., Bekvalac, K., Svirčev, E., Beara, I., Lesjak, M., Mimica-Dukić, N. (2014). Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food chemistry*, 143, 48-53
- Overman, A., Bumrungpert, A., Kennedy, A., Martinez, K., Chuang, C., West, T., Dawson, B. (2010). Polyphenol-rich grape powder extract (GPE) attenuates inflammation in human macrophages and in human adipocytes exposed to macrophage-conditioned media. *International Journal of Obesity*, 34(5), 800–808.
- Ozaslan, M., Didem Karagöz, I., Kalender, M. E., Kilic, I. H., Sari, I., & Karagöz, A. (2007). *In vivo* antitumoral effect of *Plantago major* L. extract on Balb/C mouse with Ehrlich ascites tumor. *The American journal of Chinese medicine*, 35(05), 841-851.
- Paixão, N., Perestrelo, R., Marques, J. C., Câmara, J. S. (2007). Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chemistry*, 105(1), 204–214.
- Pannunzio, A., Coluccia, M. (2018). Cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-1 inhibitors in cancer: A review of oncology and medicinal chemistry literature. *Pharmaceuticals*, 11(4), 1–20.
- Park, C. M., Song, Y. S. (2019). Luteolin and luteolin-7-*O*-glucoside protect against acute liver injury through regulation of inflammatory mediators and antioxidative enzymes in GalN/LPS-induced hepatic ICR mice. *Nutrition Research and Practice*, 13(6), 473–479.
- Park, J. Y., Pillinger, M. H., Abramson, S. B. (2006). Prostaglandin E₂ synthesis and secretion: the role of PGE₂ synthases. *Clinical immunology*, 119(3), 229-240.
- Park, K. S., Kim, B. H., Chang, I. M. (2010). Inhibitory potencies of several iridoids on cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2 enzymes activities, tumor necrosis factor- α and nitric oxide production *in vitro*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 7(1), 41-45.
- Pavlidou, E., Mantzourou, M., Fasoulas, A., Tryfonos, C., Petridis, D., Giaginis, C. (2018). Wine: An Aspiring Agent in Promoting Longevity and Preventing Chronic Diseases. *Diseases*, 6(3), 73.
- Pei, S., Yang, X., Wang, H., Zhang, H., Zhou, B., Zhang, D., Lin, D. (2015). Plantamajoside, a potential anti-tumor herbal medicine inhibits breast cancer growth and pulmonary metastasis by decreasing the activity of matrix metalloproteinase-9 and-2. *BMC cancer*, 15(1), 1-12.
- Penglis, P. S., Cleland, L. G., Demasi, M., Caughey, G. E., James, M. J. (2000). Differential regulation of prostaglandin E₂ and thromboxane A₂ production in human monocytes: implications for the use of cyclooxygenase inhibitors. *The Journal of Immunology*, 165(3), 1605-1611.
- Percival, M. D. (2003). Continuous spectrophotometric assay amenable to 96-well plate format for prostaglandin E synthase activity. *Analytical Biochemistry*, 313(2), 307–310.
- Pereañez, J. A., Nuñez, V., Patiño, A. C., Londoño, L., Quintana, J. C. (2011). Inhibitory effects of plant phenolic compounds on enzymatic and cytotoxic activities induced by a snake venom phospholipase A₂. *Vitae*, 18(3), 295–304.

- Perrone, M. G., Scilimati, A., Simone, L., Vitale, P. (2010). Selective COX-1 inhibition: A therapeutic target to be reconsidered. *Current Medicinal Chemistry*, 17(32), 3769-3805
- Petrovic, N., Murray, M. (2010). Using N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) to assay cyclooxygenase activity *in vitro*. In *Advanced Protocols in Oxidative Stress II* (pp. 129-140). Humana Press.
- Ayoub, S. S. (2010). Chapter 9 *In Vitro Cyclooxygenase Activity Assay*. 644(6), *Phytotherapy Research*, 12(SUPPL. 1), 1997–1998.
- Poor, M. H. S., Khatami, M., Azizi, H., Abazari, Y. (2017). Cytotoxic activity of biosynthesized Ag nanoparticles by *Plantago major* towards a human breast cancer cell line. *Rendiconti Lincei*, 28(4), 693-699.
- 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).
- Rainsford, K. D. (2007). Anti-inflammatory drugs in the 21st century u R. E. Harris (ed.) *Inflammation in the Pathogenesis of Chronic Diseases*, 42. 3–27. Springer
- Rakić, S., Maletić, R. O., Perunović, M. N., & Svrzić, G. (2004). Influence of thermal treatment on tannin content and antioxidation effect of oak acorn *Quercus cerris* extract. *Journal of Agricultural Sciences, Belgrade*, 49(1), 97-107.
- Ramanadham, S., Tomader, A., Ashley, J. W., Bone, R. N., Hancock, W. D., Lei, X. (2015). Calcium-independent phospholipases A₂ and their roles in biological processes and diseases. *Journal of Lipid Research*, 56(9), 1643–1668.
- Raso, G. M., Meli, R., Di Carlo, G., Pacilio, M., Di Carlo, R. (2001). Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sciences*, 68(8), 921–931.
- Rastija, V., Srećnik, G. (2009). Polyphenolic composition of Croatian wines with different geographical origins. *Food Chemistry*, 115(1), 54-60.
- Ravn, H. W., Mondolot, L., Kelly, M. T., Lykke, A. M. (2015). Plantamajoside—A current review. *Phytochemistry Letters*, 12, 42-53.
- Renaud, S. D., de Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, 339(8808), 1523-1526.
- Ribeiro, D., Freitas, M., Tomé, S. M., Silva, A. M., Laufer, S., Lima, J. L., Fernandes, E. (2014): Flavonoids inhibit COX-1 and COX-2 enzymes and cytokine/chemokine production in human whole blood. *Inflammation*, 38(2), 858-870.
- Ricciotti, E., Fitzgerald, G. A. (2011). Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(5), 986–1000.
- Richmond, G. S., Smith, T. K. (2011). Phospholipases A₁. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(1), 588–612.
- Rico, M., Sánchez, I., Trujillo, C., Pérez, N. (2013). Screening of the antioxidant properties of crude extracts of six selected plant species from the Canary Islands (Spain). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 86(1), 217–220.
- Riendeau, D., Charleson, S., Cromlish, W., Mancini, J. a, Wong, E., Guay, J. (1997). Comparison of the cyclooxygenase-1 inhibitory properties of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and selective COX-2 inhibitors, using sensitive microsomal and platelet assays. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 75(9), 1088–1095.
- Ringbom, T., Segura, L., Noreen, Y., Perera, P., Bohlin, L. (1998). Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. *Journal of natural products*, 61(10), 1212-1215.
- Rioux, N., Castonguay, A. (2000). The induction of cyclooxygenase-1 by a tobacco carcinogen in U937 human macrophages is correlated to the activation of NF-κB. *Carcinogenesis*, 21(9), 1745-1751.
- Ro, J. Y., Ryu, J. H., Park, H. J., Cho, H. J. (2015). Onion (*Allium cepa* L.) peel extract has anti-platelet effects in rat platelets. *SpringerPlus*, 4 (1), 1-8.
- Ronchetti, S., Migliorati, G., Bruscoli, S., Riccardi, C. (2018). Defining the role of glucocorticoids in inflammation. *Clinical Science*, 132(14), 1529–1543.
- Rønsted, N., Franzyk, H., Mølgaard, P., Jaroszewski, J. W., Jensen, S. R. (2003). Chemotaxonomy and evolution of *Plantago* L. *Plant Systematics and Evolution*, 242(1), 63-82.

- Rosillo, M. A., Sanchez-Hidalgo, M., Cárdeno, A., Alarcón De La Lastra, C. (2011). Protective effect of ellagic acid, a natural polyphenolic compound, in a murine model of Crohn's disease. *Biochemical Pharmacology*, 82(7), 737–745.
- Rotelli, A. E., Guardia, T., Juárez, A. O., De la Rocha, N. E., Pelzer, L. E. (2003). Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacological research*, 48(6), 601–606.
- Rouzer, C. A., Marnett, L. J. (2009). Cyclooxygenases: structural and functional insights. *Journal of lipid research*, 50, S29–S34.
- Sakai, H., Suzuki, T., Takahashi, Y., Ukai, M., Tauchi, K., Fujii, T., Horikawa, N., Minamimura, T., Tabuchi, Y., Morii, M., Tsukada, K., Takeguchi, N. (2006). Upregulation of thromboxane synthase in human colorectal carcinoma and the cancer cell proliferation by thromboxane A₂. *FEBS Letters*, 580(14), 3368–3374.
- Samuelsen, A. B. (2000). The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *Journal of ethnopharmacology*, 71(1-2), 1-21.
- Sanduja, S. K., Mehta, K., Xu, X. M., Hsu, S. M., Sanduja, R., Wu, K. K. (1991). Differentiation-associated expression of prostaglandin H and thromboxane A synthases in monocytoid leukemia cell lines. *Blood*, 78(12), 3178–3185.
- Sant, S., Tandon, M., Menon, V., Gudi, G., Kattige, V., Joshi, N. K., Korukonda, K., Levine-Dolberg, O. (2018). GRC 27864, novel, microsomal prostaglandin E synthase-1 enzyme inhibitor: phase 1 study to evaluate safety, PK and biomarkers in healthy, adult subjects. *Osteoarthritis and Cartilage*, 26, S351–S352.
- Santangelo, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Di Benedetto, R., Filesi, C., Masella, R. (2007). Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanita*, 43(4), 394–405
- Sarnpitak, P., Mujumdar, P., Morisseau, C., Hwang, S. H., Hammock, B., Iurchenko, V., Zozulya, S., Gavalas, A., Geronikaki, A., Ivanenkov, Y., Krasavin, M. (2014). Potent, orally available, selective COX-2 inhibitors based on 2-imidazoline core. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 84, 160–172.
- Sathler, P. C., Santana, M., Lourenço, A. L., Rodrigues, C. R., Abreu, P., Cabral, L. M., Castro, H. C. (2014). Human thromboxane synthase: Comparative modeling and docking evaluation with the competitive inhibitors Dazoxiben and Ozagrel. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29(4), 527–531.
- Schaible, A. M., Traber, H., Temml, V., Noha, S. M., Filosa, R., Peduto, A., Weingel, C., Barz, D., Schuster, D., Werz, O. (2013). Potent inhibition of human 5-lipoxygenase and microsomal prostaglandin E2 synthase-1 by the anti-carcinogenic and anti-inflammatory agent embelin. *Biochemical Pharmacology*, 86(4), 476–486.
- Schneider, N., Lanz, S., Ramer, R., Schaefer, D., Goppelt-Struebe, M. (2001). Up-regulation of cyclooxygenase-1 in neuroblastoma cell lines by retinoic acid and corticosteroids. *Journal of neurochemistry*, 77(2), 416–424.
- Seeram, N. P., Zhang, Y., Nair, M. G. (2003). Inhibition of proliferation of human cancer cells and cyclooxygenase enzymes by anthocyanidins and catechins. *Nutrition and Cancer*, 46(1), 101–106.
- Sergent, T., Piront, N., Meurice, J., Toussaint, O., Schneider, Y. J. (2010). Anti-inflammatory effects of dietary phenolic compounds in an *in vitro* model of inflamed human intestinal epithelium. *Chemico-Biological Interactions*, 188(3), 659–667.
- Sharifa, A. A., Neoh, Y. L., Iswadi, M. I., Khairul, O., Abdul Halim, M., Jamaludin, M., Azaman, A.B.M., Hing, H. L. (2008). Effects of methanol, ethanol and aqueous extract of *Plantago major* on gram positive bacteria, gram negative bacteria and yeast. *Annals of Microscopy*, 8, 42–44.
- Shay, A. E., Diwakar, B. T., Guan, B. J., Narayan, V., Urban, J. F., Prabhu, K. S. (2017). IL-4 up-regulates cyclooxygenase-1 expression in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 292(35), 14544–14555.
- Sivaramakrishnan, V., Devaraj, S. N. (2009): Morin regulates the expression of NF-κB-p65, COX-2 and matrix metalloproteinases in diethylnitrosamine induced rat hepatocellular carcinoma. *Chemico-biological interactions*, 180(3), 353–359.
- Sjögren, T., Nord, J., Ek, M., Johansson, P., Liu, G., Geschwindner, S. (2013). Crystal structure of microsomal prostaglandin E2 synthase provides insight into diversity in the MAPEG superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(10), 3806–3811
- Smith, M. A., Zhang, H., Purves, R. W. (2014). Identification and distribution of oxygenated fatty acids in *Plantago* seed lipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(8), 1313–1322.

- Smith, W. L., Murphy, R. C. (2015). The Eicosanoids: Cyclooxygenase, Lipoxygenase and Epoxygenase Pathways. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes: Sixth Edition* (Sixth Edition).
- Smyth, E. M. (2010). Thromboxane and the thromboxane receptor in cardiovascular disease. *Clinical Lipidology*, 5(2), 209–219.
- Sobhani, M., Farzaei, M. H., Kiani, S., Khodarahmi, R. (2020). Immunomodulatory; Anti-inflammatory/antioxidant Effects of Polyphenols: A Comparative Review on the Parental Compounds and Their Metabolites. *Food Reviews International*, 1–53.
- Soltani, G. M., Hemati, S., Sarvizadeh, M., Kamalinejad, M., Tafazoli, V., Latifi, S. A. H. (2020). Efficacy of the *Plantago major* L. syrup on radiation induced oral mucositis in head and neck cancer patients: A randomized, double blind, placebo-controlled clinical trial. *Complementary Therapies in Medicine*, 51, 102397.
- Son, D. J., Akiba, S., Hong, J. T., Yun, Y. P., Hwang, S. Y., Park, Y. H., Lee, S. E. (2014). Piperine inhibits the activities of platelet cytosolic phospholipase A₂ and thromboxane A₂ synthase without affecting cyclooxygenase-1 activity: different mechanisms of action are involved in the inhibition of platelet aggregation and macrophage inflammation. *Nutrients*, 6(8), 3336–3352.
- Son, D. J., Cho, M. R., Jin, Y. R., Kim, S. Y., Park, Y. H., Lee, S. H., Yun, Y. P. (2004). Antiplatelet effect of green tea catechins: a possible mechanism through arachidonic acid pathway. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, 71(1), 25–31.
- Sonnweber, T., Pizzini, A., Nairz, M., Weiss, G., Tancevski, I. (2018). Arachidonic acid metabolites in cardiovascular and metabolic diseases. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3285.
- Sook Chi, Y., Sun Cheon, B., Pyo Kim, H. (2001). Effect of wogonin, a plant flavone from scutellaria radix, on the suppression of cyclooxygenase-2 and the induction of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells. *Biochemical Pharmacology*, 61(10), 1195–1203.
- Spahiu, L., Stenberg, P., Larsson, C., Wannberg, J., Alterman, M., Kull, B., Nekhotiaeva, N., Morgenstern, R. (2011). A facilitated approach to evaluate the inhibitor mode and potency of compounds targeting microsomal prostaglandin e synthase-1. *Assay and Drug Development Technologies*, 9(5), 487–495
- Spanier, G., Xu, H., Xia, N., Tobias, S., Deng, S., Wojnowski, L., Forstermann, U., Li, H. (2009). Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx1) and NADPH oxidase subunit (Nox4). *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 60 Suppl 4(11), 111–116.
- Spisni, E., Valerii, M. C., De Fazio, L., Cavazza, E., Borsetti, F., Sgromo, A., Strillacci, A. (2015). Cyclooxygenase-2 silencing for the treatment of colitis: a combined *in vivo* strategy based on RNA interference and engineered *Escherichia Coli*. *Molecular Therapy*, 23(2), 278–289.
- Stables, M. J., Gilroy, D. W. (2011). Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Progress in Lipid Research*, 50(1), 35–51.
- Stanisavljević, I. T., Stojičević, S. S., Veličković, D. T., Lazić, M. L., Veljković, V. B. (2008). Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the extracts from plantain (*Plantago major* L.) leaves. *Separation Science and Technology*, 43(14), 3652–3662.
- Stavridou, K., Soufleros, E. H., Bouloumpasi, E., Dagkli, V. (2016). The phenolic potential of wines from French grape varieties Cabernet Sauvignon, Merlot and Syrah cultivated in the region of Thessaloniki (Northern Greece) and its evolution during aging. *Food and Nutrition Sciences*, 07(02), 122–137.
- Stenholm, Å., Göransson, U., Bohlin, L. (2012). Bioassay-guided Supercritical Fluid Extraction of Cyclooxygenase-2 Inhibiting Substances in *Plantago major* L. *Phytochemical Analysis*, 24(2), 176–183.
- Stewart, L. K., Soileau, J. L., Ribnicky, D., Wang, Z. Q., Raskin, I., Poulev, A., Majewski, M., Cefalu, W. T., Gettys, T. W. (2008). Quercetin transiently increases energy expenditure but persistently decreases circulating markers of inflammation in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Metabolism*, 57, S39–S46.
- Su, H.-C. (2006). Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 290(6), E1339–E1346.
- Sugimoto, T., Koizumi, T., Sudo, T., Yamaguchi, S., Kojima, A., Kumagai, S., Nishimura, R. (2007). Correlative expression of cyclooxygenase-1 (Cox-1) and human epidermal growth factor receptor type-2 (Her-2) in endometrial cancer. *Kobe Journal of Medical Sciences*, 53(5), 177–87.
- Surh, Y. J., Chun, K. S., Cha, H. H., Han, S. S., Keum, Y. S., Park, K. K., Lee, S. S. (2001). Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation

of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 480, 243-268.

Šeruga, M., Novak, I., Jakobek, L. (2011). Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, 124(3), 1208–1216.

Takabatake, M., Hishinuma, T., Suzuki, N., Chiba, S., Tsukamoto, H., Nakamura, H., Saga, T., Tomioka, Y., Kurose, A., Sawai, T., Mizugaki, M. (2002). Simultaneous quantification of prostaglandins in human synovial cell-cultured medium using liquid chromatography / tandem mass spectrometry. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 67(1), 51–56.

Takada, Y., Bhardwaj, A., Potdar, P., Aggarwal, B. B. (2004). Nonsteroidal anti-inflammatory agents differ in their ability to suppress NF- κ B activation, inhibition of expression of cyclooxygenase-2 and cyclin D1, and abrogation of tumor cell proliferation. *Oncogene*, 23(57), 9247-9258.

Takano, T., Panesar, M., Papillon, J., Cybulsky, A. V. (2000). Cyclooxygenases-1 and 2 couple to cytosolic but not group IIA phospholipase A2 in COS-1 cells. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 60(1–3), 15–26.

Takano-Ishikawa, Y., Goto, M., Yamaki, K. (2006). Structure–activity relations of inhibitory effects of various flavonoids on lipopolysaccharide-induced prostaglandin E2 production in rat peritoneal macrophages: Comparison between subclasses of flavonoids. *Phytomedicine*, 13(5), 310-317.

Tanabe, T., Tohnai, N. (2002). Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 68–69, 95–114.

Tanaka, S., Sato, T., Akimoto, N., Yano, M., Ito, A. (2004): Prevention of UVB-induced photoinflammation and photoaging by a polymethoxy flavonoid, nobiletin, in human keratinocytes *in vivo* and *in vitro*. *Biochemical pharmacology*, 68(3), 433-439.

Tarvainen, M., Suomela, J. P., Kallio, H., Yang, B. (2010). Triterpene acids in *Plantago major*: Identification, quantification and comparison of different extraction methods. *Chromatographia*, 71(3), 279-284.

Taskova, R., Evstatieva, L., Handjieva, N., & Popov, S. (2002). Iridoid patterns of genus *Plantago* L. and their systematic significance. *Zeitschrift für naturforschung C*, 57(1-2), 42-50.

Tedgui, A., Mallat, Z. (2006). Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiological reviews*, 86(2), 515-581.

This, P., Lacombe, T., Thomas, M. R. (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics*, 22(9), 511–519.

Thome, R. G., Santos, H. B. D., Santos, F. V. D., Oliveira, R. J. D. S., De Camargos, L. F., Pereira, M. N., Longatti, T. R., Souto, C. M., Franco, C.S., Schuffner, R. O. A., Ribeiro, R. I. M. A. (2012). Evaluation of healing wound and genotoxicity potentials from extracts hydroalcoholic of *Plantago major* and *Siparuna guianensis*. *Experimental Biology and Medicine*, 237(12), 1379-1386.

Ticli, F. K., Hage, L. I., Cambraia, R. S., Pereira, P. S., Magro, Â. J., Fontes, M. R., Stabeli, R.G., Giglio, J.R., Franca, S.C., Soares, M., Sampaio, S. V. (2005). Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A₂ inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. *Toxicon*, 46(3), 318-327.

Toda, K., Ueyama, M., Tanaka, S., Tsukayama, I., Mega, T., Konoike, Y., Tamenobu, A., Bastian, F., Akai, I., Ito, H., Kawakami, Y., Takahashi, T., Suzuki-Yamamoto, T. (2020). Ellagitannins from *Punica granatum* leaves suppress microsomal prostaglandin E synthase-1 expression and induce lung cancer cells to undergo apoptosis. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 84(4), 757–763.

Toyama, D. O., Ferreira, M. J. P., Romoff, P., Fávero, O. A., Gaeta, H. H., Toyama, M. H. (2014). Effect of chlorogenic acid (5-Caffeoylquinic Acid) isolated from *Baccharis oxyodonta* on the structure and pharmacological activities of secretory phospholipase A₂ from *Crotalus durissus terrificus*. *BioMed Research International*, 2014

Tribolo, S., Lodi, F., Connor, C., Suri, S., Wilson, V. G., Taylor, M. A., Needs, P., Kroon, P., Hughes, D. A. (2008). Comparative effects of quercetin and its predominant human metabolites on adhesion molecule expression in activated human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*, 197(1), 50-56.

Trulli, L., Raglione, V., Fioravanti, S. (2018)a. Selective Synthesis of Trifluoromethyl β -Lactams by a Zn-Promoted 2-Bromo Ester Addition on C-CF₃-Substituted Aldimines. *European Journal of Organic Chemistry*, 2018(27), 3743–3749.

Trulli, L., Sciubba, F., Fioravanti, S. (2018)b. Chiral trans-carboxylic trifluoromethyl 2-imidazolines by a Ag₂O-catalyzed Mannich-type reaction. *Tetrahedron*, 74(5), 572–577.

- Türel, I., Özbek, H., Erten, R., Öner, A. C., Cengiz, N., Yilmaz, O. (2009). Hepatoprotective and anti-inflammatory activities of *Plantago major* L. *Indian journal of pharmacology*, 41(3), 120.
- Tuure, L., Hämäläinen, M., Whittle, B. J., Moilanen, E. (2017). Microsomal prostaglandin E synthase-1 expression in inflammatory conditions is downregulated by dexamethasone: Seminal role of the regulatory phosphatase MKP-1. *Frontiers in Pharmacology*, 8(SEP), 1–11.
- Tzeng, S. H., Ko, W. C., Ko, F. N., Teng, C. M. (1991). Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thrombosis research*, 64(1), 91-100.
- Ueda, N., Yamashita, R., Yamamoto, S., Ishimura, K. (1997). Induction of cyclooxygenase-1 in a human megakaryoblastic cell line (CMK) differentiated by phorbol ester. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1344(1), 103-110.
- Uematsu, S., Matsumoto, M., Takeda, K., Akira, S. (2002). Lipopolysaccharide-Dependent Prostaglandin E₂ Production Is Regulated by the Glutathione-Dependent Prostaglandin E₂ Synthase Gene Induced by the Toll-Like Receptor 4/MyD88/NF-IL6 Pathway. *The Journal of Immunology*, 168(11), 5811–5816.
- Valdés López, J. F., Urcuqui-Inchima, S. (2018). Synergism between phorbol-12-myristate-13-acetate and vitamin D3 in the differentiation of U937 cells to monocytes and macrophages. *Morphologie*, 102(338), 205–218.
- Van Leeuw, R., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Dommès, J. (2014). Antioxidant capacity and phenolic composition of red wines from various grape varieties: Specificity of Pinot Noir. *Journal of Food Composition and Analysis*, 36(1–2), 40–50.
- Varban, R., Varban, D. (2012). Comparative study of the active ingredients content *Plantago lanceolata* L. *ProEnvironment/ProMediu*, 5(12).
- Vaure, C., Liu, Y. (2014). A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Frontiers in Immunology*, 5(JUL), 1–15.
- Vecchio, R., Decordi, G., Grésillon, L., Gugenberger, C., Mahéo, M., Jourjon, F. (2017). European consumers' perception of moderate wine consumption on health. *Wine Economics and Policy*, 6(1), 14–22.
- Velasco-Lezama, R., Tapia-Aguilar, R., Román-Ramos, R., Vega-Avila, E., Pérez-Gutiérrez, M. S. (2006). Effect of *Plantago major* on cell proliferation in vitro. *Journal of ethnopharmacology*, 103(1), 36-42.
- Vibes, J., Lasserre, B., Gleye, J., Declume, C. (1994). Inhibition of thromboxane A₂ biosynthesis *in vitro* by the main components of *Crataegus oxyacantha* (Hawthorn) flower heads. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 50(4), 173–175.
- Vigo, E., Cepeda, A., Gualillo, O., Perez-Fernandez, R. (2005). In-vitro anti-inflammatory activity of *Pinus sylvestris* and *Plantago lanceolata* extracts: effect on inducible NOS, COX-1, COX-2 and their products in J774A.1 murine macrophages. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57(3), 383–391.
- Vitale, P., Panella, A., Scilimati, A., Perrone, M. G. (2016). COX-1 Inhibitors: Beyond Structure Toward Therapy. *Medicinal Research Reviews*, 36(4), 641–671.
- Vogl, S., Picker, P., Mihaly-Bison, J., Fakhrudin, N., Atanasov, A. G., Heiss, E. H., Wawrosch, C., Reznicek, G., Dirsch, V.M., Saukel, J., Kopp, B. (2013). Ethnopharmacological *in vitro* studies on Austria's folk medicine - An unexplored lore in vitro anti-inflammatory activities of 71 Austrian traditional herbal drugs. *Journal of Ethnopharmacology*, 149(3), 750–771.
- Wakabayashi, I., Yasui, K. (2000). Wogonin inhibits inducible prostaglandin E₂ production in macrophages. *European Journal of Pharmacology*, 406(3), 477–481.
- Wang, L. H., Matijevic-Aleksic, N., Hsu, P. Y., Ruan, K. H., Wu, K. K., Kulmacz, R. J. (1996). Identification of thromboxane A₂ synthase active site residues by molecular modeling-guided site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 271(33), 19970–19975.
- Wang, L. H., Tsai, A. L., Hsu, P. Y. (2001). Substrate binding is the rate-limiting step in thromboxane synthase catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 276(18), 14737–14743.
- Wang, L.-H., Kulmacz, R. J. (2002). Thromboxane synthase: structure and function of protein and gene. *Prostaglandins Other Lipid Mediators*, 68, 409–422.
- Wang, X. G., Chen, G. Y., Chen, M. P. (2007). Effect of luteolin on COX-2 and mPGES-1 expression in LPS-induced RAW264. 7 cells. *Zhong yao cai= Zhongyaocai= Journal of Chinese Medicinal Materials*, 30(10), 1263-1266.
- Warner, T. D., & Mitchell, J. A. (2004). Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *The FASEB journal*, 18(7), 790-804.
- Werz, O., Seegers, J., Schaible, A. M., Weinigel, C., Barz, D., Koeberle, A., Allegrone, G., Pllastro, F., Zampieri, L., Grassi, G., Appendino, G. (2014). Cannflavins from hemp sprouts, a novel cannabinoid-free

hemp food product, target microsomal prostaglandin E₂ synthase-1 and 5-lipoxygenase. *PharmaNutrition*, 2(3), 53–60.

Wiesner, J. (2012). *Assessment report on Plantago lanceolata L., folium*. 2009(November 2011).

Willenberg, I., Meschede, A. K., Schebb, N. H. (2015). Determining cyclooxygenase-2 activity in three different test systems utilizing online-solid phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry for parallel quantification of prostaglandin E₂, D₂ and thromboxane B₂. *Journal of Chromatography A*, 1391, 40-48.

Williams, M. J. A., Sutherland, W. H. F., Whelan, A. P., McCormick, M. P., De Jong, S. A. (2004). Acute effect of drinking red and white wines on circulating levels of inflammation-sensitive molecules in men with coronary artery disease. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 53(3), 318–323. e-SPEN,

Wobst, I., Schiffmann, S., Birod, K., Maier, T. J., Schmidt, R., Angioni, C., Geisslinger, G., Grösch, S. (2008). Dimethylcelecoxib inhibits prostaglandin E₂ production. *Biochemical Pharmacology*, 76(1), 62–69.

Wong, E., DeLuca, C., Boily, C., Charleson, S., Cromlish, W., Denis, D., Kargman, B.P., Ouellet, M., Skorey, K., O'Neill, G.P., Vickers, P.J., Riendeau, D. (1997). Characterization of autocrine inducible prostaglandin H synthase-2 (PGHS-2) in human osteosarcoma cells. *Inflammation Research*, 46(2), 51-59

Woo, K. J., Jeong, Y. J., Inoue, H., Park, J. W., Kwon, T. K. (2005). Chrysin suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression through the inhibition of nuclear factor for IL-6 (NF-IL6) DNA-binding activity. *FEBS Letters*, 579(3).

World Health Organization, Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019. Geneva, World Health Organization; 2020.

World Health Organization. (1999). WHO monographs on selected medicinal plants (Vol. 2). World Health Organization.

Wu, C. M., Wu, S. C., Chung, W. J., Lin, H. C., Chen, K. T., Chen, Y. C., Hsu, M.F., Yang, J.M., Wang, J.P., Lin, C. N. (2007). Antiplatelet effect and selective binding to cyclooxygenase (COX) by molecular docking analysis of flavonoids and lignans. *International Journal of Molecular Sciences*, 8(8), 830–841.

Wu, H., Zhao, G., Jiang, K., Chen, X., Zhu, Z., Qiu, C., ... Deng, G. (2016). Plantamajoside ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via suppressing NF-κB and MAPK activation. *International Immunopharmacology*, 35, 315–322.

Xiao, X., Shi, D., Liu, L., Wang, J., Xie, X., Kang, T., Deng, W. (2011). Quercetin suppresses cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis through inactivation of P300 signaling. *PLoS ONE*, 6(8).

Xie, Z., Zhang, Z., Yu, S., Cheng, D., Zhang, H., Han, C., Lv, H., Ye, F. (2017). Synthesis and evaluation of anti-inflammatory N-substituted 3, 5-Bis (2-(trifluoromethyl) benzylidene) piperidin-4-ones. *ChemMedChem*, 12(4), 327-33

Xu, Y., Chen, J., Yu, X., Tao, W., Jiang, F., Yin, Z., Liu, C. (2010). Protective effects of chlorogenic acid on acute hepatotoxicity induced by lipopolysaccharide in mice. *Inflammation Research*, 59(10), 871–877.

Yang, R. C., Hsu, C., Lee, T. Y., Kuo, K. K., Wu, S. M., Chen, Y. H., Ho, M.L., Yao, X.H., Liu, C.H. Liu, M. S. (2013). Transcriptional regulation of the group IIA secretory phospholipase A₂ gene by C/EBPδ in rat liver and its relationship to hepatic gluconeogenesis during sepsis. *Emergency medicine open access*, 3, 151.

Yang, W., Xiong, G., Lin, B. (2020). Cyclooxygenase-1 mediates neuroinflammation and neurotoxicity in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 1–17.

Yarla, N., Bishayee, A., Vadlakonda, L., Chintala, R., Duddukuri, G., Reddanna, P., Dowluru, K. (2016). Phospholipase A₂ isoforms as novel targets for prevention and treatment of inflammatory and oncologic diseases. *Current Drug Targets*, 17(16), 1940–1962.

Yedgar, S., Cohen, Y., Shoseyov, D. (2006). Control of phospholipase A₂ activities for the treatment of inflammatory conditions. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1761(11), 1373–1382.

Yedgar, S., Lichtenberg, D., Schnitzer, E. (2000). Inhibition of phospholipase A₂ as a therapeutic target. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488(1–2), 182–187.

Yoon, H. Y., Lee, E. G., Lee, H., Cho, I. J., Choi, Y. J., Sung, M. S., Yoo, H.G., Yoo, W. H. (2013). Kaempferol inhibits IL-1β-induced proliferation of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and the production of COX-2, PGE₂ and MMPs. *International Journal of Molecular Medicine*, 32(4), 971–977.

Zhang, L., Virgous, C., Si, H. (2019). Synergistic anti-inflammatory effects and mechanisms of combined phytochemicals. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 69(March), 19–30.

Zhou, Q., Lu, W., Niu, Y., Liu, J., Zhang, X., Gao, B., Akoh, C.C., Shi, H., Yu, L. (2013). Identification and quantification of phytochemical composition and anti-inflammatory, cellular antioxidant, and radical scavenging activities of 12 *Plantago* species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(27), 6693-6702.

Zou, C., Zuo, X., Huang, J., Hua, Y., Yang, S., Yang, X., Guo, C., Tan, H., Cjen, J., Chu, Z., Pei, Yang, G. (2019). Phase I trial of pyragrel, a novel thromboxane synthetase inhibitor, to evaluate the safety, tolerability, and pharmacokinetics in healthy volunteers. *Frontiers in Pharmacology*, 10(OCT), 1–10.

Zubair, M., Ekholm, A., Nybom, H., Renvert, S., Widen, C., Rumpunen, K. (2012). Effects of *Plantago major* L. leaf extracts on oral epithelial cells in a scratch assay. *Journal of Ethnopharmacology*, 141(3), 825–830.

Zubair, M., Nybom, H., Lindholm, C., Rumpunen, K. (2011). Major polyphenols in aerial organs of greater plantain (*Plantago major* L.), and effects of drying temperature on polyphenol contents in the leaves. *Scientia Horticulturae*, 128(4), 523-529.

Zubair, M., Nybom, H., Lindholm, C., Brandner, J. M., Rumpunen, K. (2016). Promotion of wound healing by *Plantago major* L. leaf extracts—*ex-vivo* experiments confirm experiences from traditional medicine. *Natural product research*, 30(5), 622-624.

Zubair, M., Widén, C., Renvert, S., Rumpunen, K. (2019). Water and ethanol extracts of *Plantago major* leaves show anti-inflammatory activity on oral epithelial cells. *Journal of traditional and complementary medicine*, 9(3), 169-171.

<http://www.botanicni-vrt.si/component/rastline/plantago-altissima>, pristupljeno 28.01.2021.

<http://www.botanicni-vrt.si/component/rastline/plantago-argentea>, pristupljeno 28.01.2021.

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Plantago_holosteum_PID1552-1.jpg, pristupljeno 28.01.2021.

Biografija

Tatjana Majkić je rođena 15.09.1990. godine u Novom Sadu. Osnovnu školu je završila u Veterniku, a gimnaziju „Svetozar Marković“ u Novom Sadu. Osnove akademske studije biohemije na Prirodno-matematičkom fakultetu upisala je 2009. godine, a završila 2013. godine sa prosečnom ocenom 9.64. Iste godine je upisala master akademske studije biohemije koje je završila 2014. godine, sa prosečnom ocenom 10.00.



U želji da nastavi stručno usavršavanje, 2014. godine je upisala Doktorske akademske studije biohemije. Tokom doktorskih studija provela je mesec dana na stručnom usavršavanju na Fakultetu za hemiju i farmaciju u Regensburgu. Učestvovala je na letnjoj školi *Advances in Drug Discovery* (2017., Prag) i *EUROPIN Summer School on Drug Design* (2017., Beč). U okviru programa Erasmus+ razmene (Erasmus+ Training Mobility), provela je nedelju dana na Departmanu za farmaciju, Medicinskog fakulteta Univerziteta „Federiko II“ u Napulju i nedelju dana na Univerzitetu Radboud u Najmegenu.

Za uspeh tokom studiranja dobila je više nagrada i stipendija kao što su: Specijalno priznanje Srpskog hemijskog društva za izuzetne rezultate postignute u toku studiranja, stipendija „Dositeja“ Fonda za mlade talente Republike Srbije za 400 najboljih studenata završnih godina master akademskih studija 2013. godine, stipendija „Dositeja“ Fonda za mlade talente Republike Srbije za 1000 najboljih studenata završnih godina akademskih studija 2012. godine i nekoliko nagrada Univerziteta u Novom Sadu za postignute uspehe u toku studiranja. Takođe, za stručna usavršavanja u inostranstvu (letnja škola *Advances in Drug Discovery*) i učešće na konferenciji FEBS³⁺ „From molecules to living system“ dobila je stipendije organizatora.

Od 2015. do 2017. je bila Stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, a u februaru 2017. zaposlena je kao istraživač-pripravnik na projektu „Biološki aktivni prirodni proizvodi kao potencijalni izvori novih lekova i dijetetskih suplemenata“, OI 172058. Od decembra 2017. do juna 2018. bila je zaposlena kao istraživač-saradnik, a od juna 2018. godine zaposlena je kao asistent na Katedri za biohemiju i hemiju prirodnih proizvoda. Od 2014. godine je bila angažovana za izvođenje praktične nastave u okviru kurseva: Eksperimentalna biohemija, Eksperimentalne metode za ispitivanje bioloških aktivnosti, Preparativna biohemija, Osnovi biohemije, Biohemija i Čelijske kulture u biohemiji.

Autor i koautor je trinaest radova publikovanih u međunarodnim časopisima (pet M21a, četiri M21, četiri M22 kategorije) i velikog broja saopštenja na nacionalnim i internacionalnim konferencijama. Član je Biohemijskog društva Srbije, Federacije evropskih biohemijskih društava (FEBS) i Društva za proučavanje lekovitog bilja (Society of Medicinal Plant Research - GA).

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације. односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације. односно докторског уметничког пројекта.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Докторска дисертација: Модулатори метаболизма арахидонске киселине у процесу инфламације:утицај одабраних полифенола на продукцију простагландина Е ₂ и тромбоксана А ₂
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Природно-математички факултет Универзитета у Новом Саду б) Институт за јавно здравље Војводине
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Биолошки активни природни производи као потенцијални извори нових лекова и дијететских суплемената, ОИ 172058
1. Опис података
<p>1.1 Врста студије</p> <p>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</p> <p><u>Докторска дисертација; Експериментална студија</u></p> <p>1.2 Врсте података</p> <p><input checked="" type="radio"/> а) квантитативни</p> <p>б) квалитативни</p> <p>1.3. Начин прикупљања података</p> <p>а) анкете. упитници. тестови</p> <p>б) клиничке процене. медицински записи. електронски здравствени записи</p> <p><input checked="" type="radio"/> в) генотипови: навести врсту : <u>врсте боквица (<i>Plantago altissima</i> L., <i>P. argentea</i> Chaix 1785, <i>P. holosteam</i> Scop., <i>P. lanceolata</i> L. 1753, <i>P. major</i> L. 1753, <i>P. media</i> L. 1753); узорци Мерло вина</u></p> <p>г) административни подаци: навести врсту _____</p> <p><input checked="" type="radio"/> д) узорци ткива: навести врсту: <u>хумана леукемијска мијеломоноцитна ћелијска линија (U937)</u></p>

ђ) снимци. фотографије: навести врсту _____

е) текст. навести врсту: научни радови

ж) мапа. навести врсту _____

остало: описати лабораторијски експерименти

1.3 Формат података. употребљене скале. количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

а) Excel фајл. датотека _____ .xlsx _____

б) SPSS фајл. датотека _____

в) PDF фајл. датотека _____ .pdf _____

г) Текст фајл. датотека _____ .docx _____

д) JPG фајл. датотека _____ .jpg _____

е) Остало. датотека _____ .stat, .opj _____

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

а) број варијабли:

за 12 екстракта боквица 64 (53 фитохемијска параметра, утицај на продукцију два метаболита арахидонске киселине у бар два модел система и експресију mRNK 7 ензима), за 17 узорака вина 26 (24 фитохемијска параметра, утицај на продукцију два метаболита арахидонске киселине, а за 2 вина и на експресију mRNK 7 ензима), 30 стандардних и синтетских једињења на продукцију бар 2 метаболита арахидонске киселине

б) број мерења (испитаника. процена. снимака и сл.): најмање три мерења за једну варијаблу

1.3.3. Поновљена мерења

да

б) не

Уколико је одговор да. одговорити на следећа питања:

а) временски размак између поновљених мера је: у зависности од експеримента неколико минута или дана

б) варијабле које се више пута мере односе се на: анализу хемијског профила и биолошке активности екстракта боквица и узорака Мерло вина, или на анализу биолошке активности стандардних једињења

в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване: као број експеримента или нису именовани као нови фајлови, јер је су на основу понављања израчунате средње вредности које су коришћене у анализама

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

а) *Да*

б) *Не*

Ако је одговор не. образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент. навести тип : лабораторијски експерименти

б) корелационо истраживање. навести тип: Извршена је анализа главних компоненти и корелациона анализа између хемијског састава узорака и анализиране активности.

ц) анализа текста. навести тип: преглед доступне научне листературе

д) остало. навести шта _____

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

Аутоклав (VX-75, Systec), биолошки безбедни кабинет (Herasafe KS 12, Thermo Scientific), - центрифуга са хлађењем (3 – 30 K, Sigma, CO₂ инкубатор (Forma 3111, Thermo Scientific), - флуорометар (Qubit[®] Fluorometar), инвертни микроскоп (DFC290HD, Leica Microsystems), ротациони вакуум упаривач (Helidolph), спектрофотометар (Multiskan Spectrum v1.2, Thermo Scientific), Течни хроматограф серије Agilent Technologies 1200 Series са DAD детектором, куплован са Agilent Technologies 6410A Triple-Quad тандемским масеним детектором са електроспреј јонским извором(ESI); течни хроматограм високе резолуције са UV/VIS детектором (Agilent Technologies 1100 Series), термосајклер (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems) -Термосајклер са флуоресцентним детектором (Mx3000P QPCR System, Agilent Technologies) и друга лабораторијска оперема

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да Не

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) Колики је број недостајућих података? _____
- б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не
- в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података
-

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података је контролисан статистичким обрадом добијених резултата.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола уноса податка у матрицу изведена је прегледом протокола експерименталног рада и филтрирањем података у Excel фајовима, као и поређењем са подацима из научне литературе.

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Заједнички портал свих докторских дисертација и извештаја о њиховој оцени на Универзитетима у Србији (NaRDUS) и у репозиторијум докторских дисертација у Универзитета Новом Саду (CRIS).

3.1.2. URL адреса _____

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

- а) Да
- б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____
- в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

Докторска дисертација ће бити депонована у Заједнички портал свих докторских дисертација и извештаја о њиховој оцени на Универзитетима у Србији (NaRDUS) и у репозиторијум докторских дисертација Универзитета у Новом Саду (CRIS).

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? _____

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? Неограничено

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да Не

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да Не

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да Не

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- a) Подаци нису у отвореном приступу
- b) Подаци су анонимизирани
- ц) Остало, навести шта

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

јавно доступни

b) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их

користе:

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство- некомерцијално-без прераде

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Татјана Мајкић (tatjana.majkic@dh.uns.ac.rs)

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Татјана Мајкић (tatjana.majkic@dh.uns.ac.rs)

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Татјана Мајкић (tatjana.majkic@dh.uns.ac.rs)



UNIVERZITET U
NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI
FAKULTET

Departman za hemiju, biohemiju
i zaštitu životne sredine



MODULATORI METABOLIZMA
ARAHIDONSKE KISELINE U
PROCESU INFLAMACIJE: UTICAJ
ODABRANIH POLIFENOLA NA
PRODUKCIJU PROSTAGLANDINA
E₂ I TROMBOKSANA A₂

-dodatni materijal uz doktorsku disertaciju-

Mentor:
Prof. dr Ivana Beara

Kandidat:
Tatjana Majkić

Novi Sad, 2021. godine

9. Prilog

9.1. Optimizacija metode

9.1.1. Optimizacija metode na monocitima

Tabela 9.1. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 1 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	22.46	17.15	5.310	0.02521	0.02819	0.668	0.747 ± 0.073
	21.31	16.19	5.120	0.02876			
	21.95	16.92	5.030	0.03061			
Kontrola	21.30	16.51	4.790	0.03615	0.03771	0.958	
	21.98	17.84	4.140				
	21.35	16.68	4.670	0.03928			
	COX-1	GAPDH					
Proba	23.65	17.15	6.500	0.01105	0.01059	1.202	1.152 ± 0.073
	22.86	16.19	6.670	0.00982			
	23.44	16.92	6.520	0.01090			
Kontrola	23.19	16.51	6.680	0.00975	0.00919	1.061	
	24.69	17.84	6.850	0.00867			
	23.45	16.68	6.770	0.00916			
	COX-2	GAPDH					
Proba	27.64	17.15	10.49	0.00070	0.00070		
	26.76	16.19	10.57	0.00066			
	27.35	16.92	10.43	0.00072			
Kontrola	No Ct	16.51					
	No Ct	17.84					
	No Ct	16.68					

Tabela 9.2. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 2 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	22.1	16.48	5.620	0.02033	0.02400	0.625	0.738 ± 0.099
	22.38	17.13	5.250	0.02628			
	22	16.71	5.300	0.02538			
Kontrola		16.32			0.03251	0.948	
	21.75	16.73	5.020	0.03082			
	21.03	16.16	4.870	0.03420			
	COX-1	GAPDH					
Proba	23.26	16.48	6.780	0.00910	0.00832	0.799	0.731 ± 0.073
	24.20	17.13	7.070	0.00744			
	23.60	16.71	6.890	0.00843			
Kontrola	23.12	16.32	6.800	0.00897	0.01139	0.788	
	23.02	16.73	6.290	0.01278			
	22.49	16.16	6.330	0.01243			
	COX-2	GAPDH					
Proba	26.7	16.48	10.22	0.00084	0.00085		
	27.27	17.13	10.14	0.00089			
	26.96	16.71	10.25	0.00082			
Kontrola	No Ct	16.32					
	No Ct	16.73					
	No Ct	16.16					

Tabela 9.3. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 3 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	21.94	16.51	5.430	0.02320	0.02564	0.395	0.148
	22.19	16.58	5.610	0.02047		0.349	
	22.00	17.09	4.910	0.03326		0.566	
Kontrola	21.25	16.28	4.970	0.03191	0.05872	0.543	1.000 ± 0.437
	20.83	16.80	4.030	0.06121		1.042	
	31.84	28.25	3.590	0.08304		1.414	
	COX-1	GAPDH					
Proba	23.19	16.51	6.680	0.00975	0.01062	0.612	0.311
	23.03	16.58	6.450	0.01144		0.717	
	23.64	17.09	6.550	0.01067		0.669	
Kontrola	22.54	16.28	6.260	0.01305	0.01594	0.818	1.000 ± 0.257
	22.53	16.80	5.730	0.01884		1.182	
	37.21	28.25	8.960				
	COX-2	GAPDH					
Proba	26.52	16.51	10.01	0.00097	0.00088		
	27.02	16.58	10.44	0.00072			
	27	17.09	10.03	0.00096			
Kontrola	No Ct	16.28					
	No Ct	16.8					
	No Ct	28.25					

Tabela 9.4. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 4 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	21.55	16.63	4.920	0.03303	0.02262	1.468	0.987
	23.02	16.67	6.350	0.01226		0.545	
	22.35	16.88	5.470	0.02256		1.002	
Kontrola	22.53	16.52	6.010		0.02251		1.000 ± 0.064
	21.94	16.53	5.410	0.02352		1.045	
	21.36	15.82	5.540	0.02149		0.955	
	COX-1	GAPDH					
Proba	22.98	16.63	6.350	0.01226	0.01003	1.350	0.594
	23.70	16.67	7.030	0.00765		0.842	
	23.50	16.88	6.620	0.01017		1.119	
Kontrola	23.37	16.52	6.850	0.00867	0.00908	0.954	1.000 ± 0.173
	23.06	16.53	6.530	0.01082		1.191	
	22.83	15.82	7.010	0.00776		0.854	
	COX-2	GAPDH					
Proba	26.65	16.63	10.02	0.00096	0.00089		
	27.05	16.67	10.38	0.00075			
	27.00	16.88	10.05	0.00094			
Kontrola	No Ct	16.52					
	No Ct	16.53					
	No Ct	15.82					

Tabela 9.5. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 5 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	p
	cPLA ₂	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	22.42	16.75	5.670	0.01964	0.02129	0.962	1.043 ± 0.123
	22.32	16.68	5.640	0.02005		0.982	
	21.74	16.37	5.370	0.02418		1.184	
Kontrola	22.55	16.80	5.750	0.01858	0.02042	0.910	1.000 ± 0.127
	23.34	17.09	6.250				
	22.70	17.21	5.490	0.02225		1.090	
	COX-1	GAPDH					
Proba	22.74	16.75	5.990	0.01573	0.01347	1.520	1.302 ± 0.189
	23.01	16.68	6.330	0.01243		1.201	
	22.72	16.37	6.350	0.01226		1.185	
Kontrola	23.23	16.80	6.430	0.01160	0.01035	1.121	1.000 ± 0.171
	23.87	17.09	6.780	0.00910		0.879	
	23.07	17.21	5.860				
	COX-2	GAPDH					
Proba	27.76	16.75	11.01	0.00048	0.00004		
	27.95	16.68	11.27	0.00040			
	27.16	16.37	10.79	0.00056			
Kontrola	No Ct	16.8					
	No Ct	17.09					
	No Ct	17.21					

Tabela 9.6. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 6 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	p
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	22.00	17.17	4.830	0.03516	0.02741		0.918 ± 0.036
	21.99	16.62	5.370	0.02418		0.944	
	22.41	16.96	5.450	0.02288		0.893	
Kontrola	22.19	16.74	5.450	0.02288	0.02562	0.893	1.000 ± 0.151
	22.19	17.05	5.140	0.02836		1.107	
	COX-1	GAPDH					
Proba	23.09	17.17	5.920	0.01652	0.01224	1.251	0.927 ± 0.281
	23.21	16.62	6.590	0.01038		0.786	
	23.63	16.96	6.670	0.00982		0.744	
Kontrola	23.13	16.74	6.390	0.01192	0.01320	0.903	1.000 ± 0.137
	23.16	17.05	6.110	0.01448		1.097	
	COX-2	GAPDH					
Proba	27.68	17.17	10.51	0.00069	0.00058		
	27.39	16.62	10.77	0.00057			
	28.02	16.96	11.06				
Kontrola	No Ct	16.74					
	No Ct	17.05					

Tabela 9.7. Promena ekspresije *cPLA₂α*, *COX-1* i *COX-2* mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 7 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	<i>cPLA₂α</i>	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	22.58	16.77	5.810	0.01782	0.01600	1.198	0.662
	24.01	17.87	6.140	0.01418		0.953	
		17.13					
Kontrola	22.98	17.13	5.850	0.01734	0.01488	1.165	1.000 ± 0.143
	23.11	16.91	6.200	0.01360		0.914	
	23.2	17.01	6.190	0.01370		0.921	
	<i>COX-1</i>	GAPDH					
Proba	24.96	16.77	8.190		0.00573		0.211
	25.53	17.87	7.660	0.00494		0.635	
	24.39	17.13	7.260	0.00652		0.838	
Kontrola	24.09	17.13	6.960	0.00803	0.00779	1.031	1.000 ± 0.044
	23.96	16.91	7.050	0.00755		0.969	
	24.47	17.01	7.460				
	<i>COX-2</i>	GAPDH					
Proba	No Ct	16.77					
	27.81	17.87	9.94	0.0010	0.00107		
	26.92	17.13	9.79	0.0011			
Kontrola	No Ct	17.13					
	No Ct	16.91					
	No Ct	17.01					

Tabela 9.8. Promena ekspresije *cPLA₂α*, *COX-1* i *COX-2* mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 8 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	<i>cPLA₂α</i>	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	23.26	16.93	6.330	0.01243	0.01658	0.633	0.385
	22.93	17.41	5.520	0.02179		1.110	
	23.86	17.85	6.010	0.01552		0.790	
Kontrola	22.74	16.99	5.750	0.01858	0.01964	0.946	1.000 ± 0.082
	23.14	17.41	5.730	0.01884		0.959	
	25.82	20.28	5.540	0.02149		1.094	
	<i>COX-1</i>						
Proba	23.95	16.93	7.020	0.00770	0.00953	0.772	0.289
	23.75	17.41	6.340	0.01234			
	24.72	17.85	6.870	0.00855		0.857	
Kontrola	23.92	16.99	6.930	0.00820	0.00998	0.822	1.000 ± 0.226
	24.17	17.41	6.760	0.00923		0.924	
	26.6	20.28	6.320	0.01252		1.254	
	<i>COX-2</i>						
Proba	27.21	16.93	10.28	0.0008	0.00096		
	27.03	17.41	9.62	0.0013			
	28.15	17.85	10.3	0.0008			
Kontrola	No Ct	16.99					
	No Ct	17.41					
	No Ct	20.28					

Tabela 9.9. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNA pri uslovima prikazanim u Probi 9 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNA/GAPDH mRNA	p	
	cPLA ₂ α		GAPDH		Srednja vrednost			
Proba	22.61	16.91	5.700	0.0192	0.0190	1.248	1.231 ± 0.015	0.030
	22.52	16.79	5.730	0.0188				
	23.46	17.73	5.730	0.0188				
Kontrola	23.02	16.97	6.050	0.0151	0.0154	0.979	1.000 ± 0.029	
	22.88							
	23.14	17.15	5.990	0.0157				
	COX-1		GAPDH					
Proba	23.36	16.91	6.450	0.011	0.008	1.091	0.751 ± 0.481	0.597
	24.65	16.79	7.860	0.004				
		17.73						
Kontrola	23.76	16.97	6.790	0.009	0.010	0.862	1.000 ± 0.195	
	23.49							
	23.54	17.15	6.390	0.012				
	COX-2		GAPDH					
Proba	26.96	16.91	10.05	0.0009	0.0009			
	27.01	16.79	10.22	0.0008				
	27.73	17.73	10	0.0010				
Kontrola	No Ct	16.97						
	No Ct							
	No Ct	17.15						

Tabela 9.10. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNA pri uslovima prikazanim u Probi 10 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNA/GAPDH mRNA	p	
	cPLA ₂ α		GAPDH		Srednja vrednost			
Proba	22.74	17.12	5.620	0.02033	0.01479	3.574	2.601 ± 1.066	0.118
	22.92	16.93	5.990	0.01573				
	24.67	17.76	6.910	0.00832				
Kontrola	29.22	30.3			0.00569	0.598	1.000 ± 0.569	
	28.3	19.95	8.200	0.00340				
	23.36	16.96	6.970	0.00798				
	COX-1		GAPDH					
Proba		17.12			0.00960	1.942	1.687 ± 0.361	0.307
	23.43	16.93	6.500	0.01105				
	24.7	17.76	6.940	0.00814				
Kontrola	33.88	30.3	3.580		0.00569	0.598	1.000 ± 0.569	
	28.15	19.95	8.200	0.00340				
	23.93	16.96	6.970	0.00798				
	COX-2		GAPDH					
Proba	27.3	17.12	10.18	0.0009	0.00072			
	27.34	16.93	10.41	0.0007				
	28.52	17.76	10.76	0.0006				
Kontrola	No Ct	30.3						
	No Ct	19.95						
	No Ct	16.96						

Tabela 9.11. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNA pri uslovima prikazanim u Probi 11 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNA/GAPDH mRNA	<i>p</i>	
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost		
Proba	24.21	17.87	6.340	0.0123	0.01597	0.972	1.257 ± 0.282	0.348
	23.38	17.7	5.680	0.0195		1.535		
	22.82	16.86	5.960	0.0161		1.264		
Kontrola	22.89	16.68	6.210	0.0135	0.01271	1.063	1.000 ± 0.310	
	24.78	17.89	6.890	0.0084		0.664		
	22.71	16.76	5.950	0.0162		1.273		
	COX-1	GAPDH						
Proba	25.36	17.87	7.490	0.00556	0.00731	0.723	0.950 ± 0.209	0.768
	24.54	17.7	6.840	0.00873		1.134		
	23.89	16.86	7.030	0.00765		0.994		
Kontrola	23.68	16.68	7.000	0.00781	0.00770	1.015	1.000 ± 0.174	
	25.2	17.89	7.310	0.00630		0.819		
	23.56	16.76	6.800	0.00897		1.166		
	COX-2	GAPDH						
Proba	29.34	17.87	11.47	0.0004	0.00051			
	28.4	17.7	10.7	0.0006				
	27.65	16.86	10.79	0.0006				
Kontrola	No Ct	16.68						
	No Ct	17.89						
	No Ct	16.76						

Tabela 9.12. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNA pri uslovima prikazanim u Probi 12 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNA/GAPDH mRNA	<i>p</i>	
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost		
Proba	23.5	18.09	5.41	0.02352	0.02045	1.480	1.287 ± 0.169	0.097
	23.96	18.21	5.75	0.01858		1.169		
	24	18.34	5.7	0.01924		1.210		
Kontrola	23.98	17.83	6.15	0.01408	0.01589	0.886	1.000 ± 0.156	
	23.83	17.76	6.07	0.01488		0.937		
	23.73	17.99	5.74	0.01871		1.177		
	COX-1	GAPDH						
Proba	No Ct	18.09						
	No Ct	18.21						
	No Ct	18.34						
Kontrola	24.26	17.83	6.43	0.01160	0.00876	1.324	1.000 ± 0.672	
	24.06	17.76	6.3	0.01269		1.449		
	26.96	17.99	8.97	0.00199		0.228		
	COX-2	GAPDH						
Proba	27.28	18.09	9.190	0.00171	0.00151			
	27.66	18.21	9.450	0.00143				
	28	18.34	9.490	0.00139				
Kontrola	No Ct	17.83						
	No Ct	17.76						
	No Ct	17.99						

Tabela 9.13. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNA pri uslovima prikazanim u Probi 13 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNA/GAPDH mRNA	p
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	22.29	15.95	6.340	0.01234	0.01342	0.757	0.823 ± 0.101
	22.40	16.09	6.310	0.01260		0.773	
	21.39	15.36	6.030	0.01530		0.939	
Kontrola	27.72	22.03	5.690	0.01937	0.01630	1.188	1.000 ± 0.266
	23.93	16.00	7.930				
	21.6	15.36	6.240	0.01323		0.812	
	COX-1	GAPDH					
Proba	22.92	15.95	6.970	0.00798	0.00730	0.948	0.868 ± 0.090
	23.36	16.09	7.270	0.00648		0.770	
	22.43	15.36	7.070	0.00744		0.885	
Kontrola	28.62	22.03	6.590	0.01038	0.00841	1.234	1.000 ± 0.220
	22.94	16.00	6.940	0.00814		0.968	
	22.58	15.36	7.220	0.00671		0.797	
	COX-2	GAPDH					
Proba	28.93	15.95	12.98	0.00012	0.00026		
	28.36	16.09	12.27	0.00020			
	26.51	15.36	11.15	0.00044			
Kontrola	No Ct	22.03					
	No Ct	16.00					
	No Ct	15.36					

Tabela 9.14. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNA pri uslovima prikazanim u Probi 14 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNA/GAPDH mRNA	p
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	23.71	18.79	4.920	0.03303	0.01733	2.534	1.994 ± 0.763
	38.85	17.91	20.94	0.00000			
	24	18.15	5.720	0.01897		1.455	
Kontrola	24.14	18.29	5.850	0.01734	0.01304	1.330	1.000 ± 0.292
	23.61	17.19	6.420	0.01168		0.896	
	24.58	17.95	6.630	0.01010		0.774	
	COX-1	GAPDH					
Proba	24.48	18.79	5.690	0.01937	0.01327	2.882	1.974 ± 0.810
	24.72	17.91	6.810	0.00891		1.326	
	25	18.15	6.440	0.01152		1.714	
Kontrola	25.13	18.29	6.840	0.00873	0.00672	1.299	1.000 ± 0.267
	24.76	17.19	7.570	0.00526		0.783	
	25.29	17.95	7.340	0.00617		0.918	
	COX-2	GAPDH					
Proba	26.18	18.79	7.390	0.0060	0.0041		
	26.38	17.91	8.470	0.0028			
	26	18.15	8.110	0.0036			
Kontrola	No Ct	18.29					
	No Ct	17.19					
	No Ct	17.95					

Tabela 9.15. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 15 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>	
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost		
Proba	25.88	20.96	4.92	0.03303	0.03107	0.904	0.850 ± 0.051	0.081
	26.20	21.11	5.09	0.02936		0.803		
	25.00	20.32	5.02	0.03082		0.843		
Kontrola	25.38	20.55	4.83	0.03516	0.03655	0.962	1.000 ± 0.054	
	25.9	20.47	5.43	0.02320		0.635		
	25.4	20.68	4.72	0.03794		1.038		
	COX-1	GAPDH						
Proba	27.49	20.96	6.530	0.01082	0.00940	2.157	1.872 ± 0.301	0.024
	27.82	21.11	6.710	0.00955		1.904		
	27.32	20.32	7.000	0.00781		1.557		
Kontrola	27.00	20.55	6.45		0.00502		1.000 ± 0.132	
	27.98	20.47	7.51	0.00549		1.093		
	28.46	20.68	7.78	0.00455		0.907		
	COX-2	GAPDH						
Proba	30.59	20.96	9.630	0.00126	0.00120			
	31.42	21.11	10.31	0.00079				
	29.66	20.32	9.340	0.00154				
Kontrola	No Ct	20.55						
	No Ct	20.47						
	No Ct	20.68						
	mPGES-1	GAPDH						
Proba	33.93	21.24	12.69	0.00015	0.00007	5.766	3.808 ± 2.769	0.383
	35.84	21.51	14.33	0.00005		1.850		
	39.34	20.77	18.57	0.00000		0.098		
Kontrola	37.00	20.82	16.18	0.00001	0.00003	0.513	1.000 ± 0.552	
	35.11	20.57	14.54	0.00004		1.599		
	36.26	20.87	15.39	0.00002		0.887		
	mPGES-2	GAPDH						
Proba	29.74	21.24	8.500		0.00469	0.431	0.732 ± 0.111	0.118
	29.10	21.51	7.590	0.00519		0.810		
	28.67	20.77	7.900	0.00419		0.654		
Kontrola	27.94	20.82	7.120	0.00719	0.00641	1.122	1.000 ± 0.162	
	28.15	20.57	7.580	0.00523		0.816		
	28.07	20.87	7.200	0.00680		1.06		
	TXAS	GAPDH						
Proba	28.11	21.24	6.870	0.00855	0.01181	0.387	0.535 ± 0.205	0.041
	28.17	21.51	6.660	0.00989		0.448		
	26.65	20.77	5.880	0.01698		0.770		
Kontrola	26.43	20.82	5.610	0.02047	0.02206	0.928	1.000 ± 0.098	
	26.13	20.57	5.560	0.02120		0.961		
	26.22	20.87	5.350	0.02452		1.111		

Tabela 9.16. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 16 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	22.4	15.09	7.310	0.0063	0.01236	1.650	1.404 ± 0.347
	20.9	15.11	5.790	0.0181			
	22.08	15.78	6.300	0.0127			
Kontrola	21.75	14.92	6.830	0.0088	0.01096	0.802	1.000 ± 0.229
	20.98	14.39	6.590	0.0104			
	20	13.81	6.190	0.0137			
	COX-1	GAPDH					
Proba	22.97	15.09	7.880	0.00425	0.00468	0.872	0.961 ± 0.083
	22.74	15.11	7.630	0.00505			
	23.5	15.78	7.720	0.00474			
Kontrola	22.42	14.92	7.500	0.00552	0.00487	1.134	1.000 ± 0.190
	22.28	14.39	7.890	0.00422			
	22.51	13.81	8.700				
	COX-2	GAPDH					
Proba	29.26	15.09	14.17	0.00005	0.00011		
	27.38	15.11	12.27	0.00020			
	29.45	15.78	13.67	0.00008			
Kontrola	No Ct	14.92					
	No Ct	14.39					
	No Ct	13.81					

Tabela 9.17. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 17 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	21	14.03	6.970	0.0080	0.01274	0.962	0.833 ± 0.182
	19.97	14.13	5.840	0.0175			
	21.86	15.57	6.290	0.0128			
Kontrola	21.76	14.93	6.830		0.01814	1.024	1.000 ± 0.034
	21.51	15.76	5.750	0.0186			
	20.85	15.03	5.820	0.0177			
	COX-1	GAPDH					
Proba	22.56	14.03	8.530	0.00271	0.00428	0.741	0.866 ± 0.177
	21.98	14.13	7.850	0.00433			
	23	15.57	7.430	0.00580			
Kontrola	22.51	14.93	7.580	0.00523	0.00585	0.893	1.000 ± 0.151
	24.49	15.76	8.730				
	22.3	15.03	7.270	0.00648			
	COX-2	GAPDH					
Proba	27.59	14.03	13.56	0.00008	0.00013		
	26.43	14.13	12.3	0.00020			
	28.68	15.57	13.11	0.00011			
Kontrola	No Ct	14.93					
	No Ct	15.76					
	No Ct	15.03					

Tabela 9.18. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 18 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	25.4	19.04	6.360	0.01217	0.01338	0.711	0.361
	24.49	18.04	6.450	0.01144		0.668	
	24	17.92	5.920	0.01652		0.965	
Kontrola	24.1	17.65	6.450	0.01144	0.01712	0.668	1.000± 0.313
	23.98	18.17	5.810	0.01782		1.041	
	27.27	21.77	5.500	0.02210		1.291	
	COX-1	GAPDH					
Proba	26.21	19.04	7.170	0.00694	0.00673	0.928	0.359
	25.51	18.04	7.470	0.00564		0.754	
	24.96	17.92	7.040	0.00760		1.016	
Kontrola	24.77	17.65	7.120	0.00719	0.00758	0.961	1.013 ± 0.143
	25	18.17	6.830	0.00879		1.175	
	28.98	21.77	7.210	0.00675		0.903	
	COX-2	GAPDH					
Proba	26.43	19.04	7.39	0.00596	0.00542		
	25.84	18.04	7.8	0.00449			
	25	17.92	7.43	0.00580			
Kontrola	No Ct	17.65					
	No Ct	18.17					
	No Ct	21.77					

Tabela 9.19. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 19 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	23.75	17.74	6.010	0.01552	0.01808	0.956	0.501
	23.11	17.64	5.470	0.02256		1.390	
	23.67	17.72	5.950	0.01618		0.996	
Kontrola	23.44	17.42	6.020	0.01541	0.01624	0.949	1.000± 0.066
	23.33	17.49	5.840	0.01746		1.075	
	23.15	17.17	5.980	0.01584		0.976	
	COX-1	GAPDH					
Proba	24.74	17.74	7.000	0.00781	0.00727	1.124	0.435
	24.81	17.64	7.165	0.00697		1.002	
	24.87	17.72	7.150	0.00704		1.013	
Kontrola	24.69	17.42	7.270	0.00648	0.00695	0.932	1.000± 0.063
	24.58	17.49	7.090	0.00734		1.056	
	24.32	17.17	7.150	0.00704		1.013	
	COX-2	GAPDH					
Proba	26.52	17.74	8.78	0.00227	0.00222		
	26.43	17.64	8.79	0.00226			
	26.60	17.72	8.88	0.00212			
Kontrola	No Ct	17.42					
	No Ct	17.49					
	No Ct	17.17					

Tabela 9.20. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 20 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	22.58	17.08	5.500	0.02210	0.02312	1.487	0.384
	23.22	17.88	5.340	0.02469		1.662	
	22.85	17.38	5.470	0.02256		1.518	
Kontrola	22.80	33.61			0.01486		
	23.68	16.90	6.780	0.00910		0.612	1.000 ± 0.548
	23.39	17.79	5.600	0.02062		1.388	
	COX-1	GAPDH					
Proba	24.28	17.08	7.200	0.00680	0.00821	1.908	0.321
	24.57	17.88	6.690	0.00969		2.717	
	24.32	17.38	6.940	0.00814		2.285	
Kontrola	24.71	33.61			0.00356		
	27.14	16.90	10.240	0.00083		0.232	1.000 ± 1.086
	25.10	17.79	7.310	0.00630		1.768	
	COX-2	GAPDH					
Proba	27.06	17.08	9.98	0.00099	0.00081		
	28.24	17.88	10.36	0.00076			
	27.89	17.38	10.51	0.00069			
Kontrola	No Ct	33.61					
	No Ct	16.90					
	No Ct	17.79					

Tabela 9.21. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 21 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	28.05	23.46	4.590	0.04152	0.03846	1.643	0.153
	26.24	19.97	6.270			1.522 ± 0.171	
	27.67	22.85	4.820	0.03540		1.401	
Kontrola	27.74	23.45	4.290		0.02527		
	26.53	21.46	5.070	0.02977		1.178	1.000 ± 0.252
	26.82	21.23	5.590	0.02076		0.822	
	COX-1	GAPDH					
Proba	30.80	23.46	7.340	0.00617	0.00728	0.641	0.281
	26.75	19.97	6.780	0.00910		0.945	
	30.10	22.85	7.250	0.00657		0.682	
Kontrola	29.74	23.45	6.290	0.01278	0.00963	1.327	1.000 ± 0.283
	28.43	21.46	6.970	0.00798		0.828	
	28.17	21.23	6.940	0.00814		0.845	
	COX-2	GAPDH					
Proba	31.03	23.46	7.57	0.00526	0.00368		
	30.41	19.97	10.44	0.00072			
	30.48	22.85	7.63	0.00505			
Kontrola	No Ct	23.45					
	No Ct	21.46					
	No Ct	21.23					

Tabela 9.22. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 22 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	23.57	19.81	3.760	0.07381	0.08539	1.873	0.116
	23.55	19.51	4.040	0.06079		1.543	
	22.19	19.15	3.040	0.12158		3.086	
Kontrola	23.47	18.99	4.480	0.04481	0.03940	1.137	1.000± 0.343
	23.72	19.38	4.340	0.04938		1.253	
	28.47	23.09	5.380	0.02401		0.609	
	COX-1	GAPDH					
Proba	27.25	19.81	7.4400	0.00576	0.00540	0.958	0.823
	26.91	19.51	7.4000	0.00592		0.985	
	26.94	19.15	7.7900	0.00452		0.752	
Kontrola	27.00	18.99	8.0100	0.00388	0.00601	0.645	1.000± 0.502
	26.32	19.38	6.9400	0.00814		1.355	
	28.37	23.09					
	COX-2	GAPDH					
Proba	24.45	19.81	4.640	0.0401	0.0410		
	24.69	19.51	5.180	0.0276			
	23.33	19.15	4.180	0.0552			
Kontrola	No Ct	18.99					
	No Ct	19.38					
	No Ct	23.09					

Tabela 9.23. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 23 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	22.85	18.12	4.730	0.03768	0.04836	1.641	0.068
	22.31	17.86	4.450	0.04575		1.992	
	22.72	18.70	4.020	0.06164		2.684	
Kontrola	25.74	20.34	5.400	0.02368	0.02297	1.031	1.000± 0.044
	24.64	19.15	5.490	0.02225		0.969	
	23.55	18.91	4.640				
	COX-1	GAPDH					
Proba	25.91	18.12	7.790	0.00452	0.00533	0.540	0.047
	25.60	17.86	7.740	0.00468		0.559	
	25.90	18.70	7.200	0.00680		0.813	
Kontrola	27.00	20.34	6.660	0.00989	0.00837	1.182	1.000 ± 0.161
	26.14	19.15	6.990	0.00787		0.940	
	26.00	18.91	7.090	0.00734		0.877	
	COX-2	GAPDH					
Proba	23.40	18.12	5.280	0.02574	0.03045		
	23.53	18.70	4.830	0.03516			
Kontrola	No Ct	20.34					
	No Ct	19.15					
	No Ct	18.91					

Tabela 9.24. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 24 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	22.20	18.09	4.110	0.05791	0.06718	2.116	2.455 ± 0.298
	23.30	19.53	3.770	0.07330		2.679	
	22.00	18.17	3.830	0.07032		2.570	
Kontrola	23.95	18.31	5.640	0.02005	0.02736	0.733	1.000 ± 0.378
	23.93	27.80					
	26.04	21.19	4.850	0.03467		1.267	
	COX-1	GAPDH					
Proba	26.11	18.09	8.020	0.00385	0.00459	0.446	0.531 ± 0.108
	27.00	19.53	7.470	0.00564		0.653	
	26.04	18.17	7.870	0.00427		0.495	
Kontrola	25.79	18.31	7.480	0.00560	0.00864	0.648	1.000 ± 0.497
	25.47	27.80					
	27.61	21.19	6.420	0.01168		1.352	
	COX-2	GAPDH					
Proba	23.35	18.09	5.26	0.02610	0.35375		
	24.36	19.53	4.83	0.03516			
		18.17		1.00000			
Kontrola	No Ct	18.31					
	No Ct	27.80					
	No Ct	21.19					

Tabela 9.25. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 25 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	30.09	18.21	11.88	0.00027		1.160	0.914 ± 0.385
	30.72	18.87	11.85	0.00027		1.184	
	25.15	19.92	5.23	0.02664	0.04532	0.436	
	25.29	20.41	4.88	0.03396		0.555	
	23.53	19.80	3.73	0.07536		1.233	
Kontrola	30.94	18.97	11.97	0.00025	0.00023	1.090	1.000 ± 0.210
	30.66	18.43	12.23	0.00021		0.910	
	25.67	21.24	4.43	0.04639		0.759	
	23.41	19.69	3.72	0.07589		1.241	
	COX-1	GAPDH					
Proba	25.99	13.14	12.85	0.00014	0.00015	1.071	0.907 ± 0.161
	26.15	13.38	12.77	0.00014		1.132	
	30.34	18.21	12.13	0.00022	0.00024	0.707	
	30.30	18.42	11.88	0.00027		0.841	
	25.83	20.41	5.42	0.02336	0.02760	0.851	
	25.24	19.80	5.44	0.02304		0.839	
Kontrola	26.21	12.99	13.22	0.00010	0.00013	0.828	1.000 ± 0.179
	25.99	13.27	12.72	0.00015	0.00032	1.172	
	30.56	18.97	11.59	0.00032			
	30.10	18.43	11.67	0.00031		1.028	
	25.58	20.76	4.82	0.03540	0.02745	0.972	
25.02	19.69	5.33	0.02486		1.290		
	COX-2	GAPDH					
Proba	33.90	19.51	14.39	0.00005	0.00009		
	31.33	18.21	13.12	0.00011			
	31.44	18.42	13.02	0.00012			
	32.92	19.92	13	0.00012	0.00012		
	34.03	20.41	13.62	0.00008			
	32.33	19.80	12.53	0.00017			
Kontrola	No Ct	18.97					
	No Ct	18.43					
	No Ct	20.76					
	No Ct	21.24					
	No Ct	19.69					

Tabela 9.26. Promena ekspresije *cPLA₂α*, *COX-1* i *COX-2* mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 25 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	mPGES-1	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	27.42	11.91	15.51	0.00002	0.00003	1.779	2.591 ± 0.905
	25.96	11.27	14.69	0.00004		3.141	
	27.53	12.09	15.44	0.00002		1.868	
	31.08	19.60	11.48	0.00035	0.00016	3.578	
	31.69	17.90	13.79	0.00007		0.722	
	32.36	18.42	13.94	0.00006		0.650	
Kontrola	28.18	11.99	16.19	0.00001	0.00001	1.110	1.000 ± 0.101
	28.37	11.86	16.51	0.00001		0.890	
	32.16	18.87	13.29	0.00010	0.00010	1.021	
	29.69	16.22	13.47	0.00009		0.901	
	31.88	18.67	13.21	0.00011		1.079	
	mPGES-2	GAPDH					
Proba	19.48	11.91	7.57	0.00526	0.00600	1.430	1.162 ± 0.527
	18.6	11.27	7.33	0.00622		1.689	
	19.35	12.09	7.26	0.00652		1.773	
	25.41	19.60	5.81	0.01782		0.613	
	23.48	17.90	5.58	0.02091		0.719	
	23.94	18.42	5.52	0.02179		0.750	
Kontrola	19.51	11.99	7.52		0.00368		1.000 ± 0.113
	20.16	11.86	8.30	0.00317		0.862	
	19.84	11.94	7.90	0.00419		1.138	
	23.99	18.87	5.12	0.02876	0.02906	0.990	
	22.59	16.22	6.37				
	23.76	18.67	5.09	0.02936		1.010	
	TXAS	GAPDH					
Proba	30.85	11.91	18.94	0.00000	0.00000	0.793	0.846 ± 0.154
	29.40	11.27	18.13	0.00000			
	30.85	12.09	18.76	0.00000		0.899	
	33.36	19.60	13.76	0.00007	0.00007	1.038	
	31.90	17.90	14	0.00006		0.879	
	31.99	18.42	13.57	0.00008		1.184	
Kontrola	30.77	11.99	18.78	0.00000	0.00000	0.886	1.000 ± 0.091
	30.29	11.86	18.43	0.00000		1.130	
	30.57	11.94	18.63	0.00000		0.984	
	32.63	18.87	13.76	0.00007	0.00007	1.038	
	29.58	16.22	13.36				
	32.54	18.67	13.87	0.00007		0.962	

Tabela 9.27. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 26 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	23.76	19.17	4.590	0.04152	0.04424	2.239	2.386 ± 0.552
	22.97	18.80	4.170	0.05555		2.996	
	24.54	19.73	4.810	0.03565		1.923	
Kontrola	25.26	19.17	6.090	0.01468	0.01854	0.792	1.000 ± 0.295
	24.28	18.80	5.480	0.02241		1.208	
	24.17	19.73	4.440				
	COX-1	GAPDH					
Proba	26.50	19.17	7.330	0.00622	0.00682	0.620	0.680±0.146
	25.68	18.80	6.880	0.00849		0.847	
	27.17	19.73	7.440	0.00576		0.574	
Kontrola	27.44	20.67	6.770	0.00916	0.01003	0.914	1.000±0.122
	26.77	20.25	6.520	0.01090		1.086	
	26.28	20.31	5.970				
	COX-2	GAPDH					
Proba	29.07	19.17	9.90	0.00105	0.00091		
	28.67	18.80	9.870	0.00107			
	30.41	19.73	10.68	0.00061			
Kontrola	No Ct	19.17					
	No Ct	18.80					
	No Ct	19.73					
	mPGES-1	GAPDH					
Proba	36.86	19.17	17.69	0.00000	0.00001		2.657 ±0.919
	34.97	18.8	16.17	0.00001		3.306	
	36.62	19.73	16.89	0.00001		2.007	
Kontrola	39.66	20.67	18.99	0.00000	0.00000	0.468	1.000 ±0.752
	37.53	20.25	17.28	0.00001		1.532	
	36.23	20.31	15.92				
	mPGES-2	GAPDH					
Proba	29.77	19.17	10.6	0.00064	0.00203	0.610	0.705 ± 0.134
	26.56	18.8	7.76	0.00461			
	29.94	19.73	10.21	0.00084		0.800	
Kontrola	31.09	20.67	10.42	0.00073	0.00106	0.692	1.000 ± 0.436
	29.75	20.25	9.5	0.00138		1.308	
	28.87	20.31	8.56				
	TXAS	GAPDH					
Proba	26.64	19.17	7.47	0.00564	0.00687	1.098	0.945± 0.216
	25.32	18.8	6.52	0.01090			
	27.67	19.73	7.94	0.00407		0.793	
Kontrola	28.84	20.67	8.17	0.00347	0.00514	0.676	1.000± 0.458
	27.45	20.25	7.2	0.00680		1.324	
	26.64	20.31	6.33				

Tabela 9.28. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 27 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	23.42	18.87	4.550	0.04269	0.03837	1.838	0.022
	24.77	19.33	5.440	0.02304		0.992	
	23.79	19.45	4.340	0.04938		2.126	
Kontrola	24	18.91	5.090	0.02936	0.02323	1.264	1.000 ± 0.246
	24.21	18.72	5.490	0.02225		0.958	
	24.26	18.47	5.790	0.01807		0.778	
	COX-1	GAPDH					
Proba	25.4	18.87	6.530	0.01082	0.01112	1.643	0.021
	25.9	19.33	6.570	0.01053		1.598	
	25.83	19.45	6.380	0.01201		1.823	
Kontrola	26.16	18.91	7.250	0.00657	0.00659	0.997	1.000 ± 0.235
	25.66	18.72	6.940	0.00814		1.236	
	26.1	18.47	7.630	0.00505		0.766	
	COX-2	GAPDH					
Proba	27.78	18.87	8.910	0.00208	0.00225		
	28.03	19.33	8.700	0.00240			
	28.23	19.45	8.780	0.00227			
Kontrola	No Ct	18.91					
	No Ct	18.72					
	No Ct	18.47					

Tabela 9.29. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 28 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	28.85	33.63	-4.780		0.02001		0.291
	29.86	23.8	6.060	0.01499		1.519	
	31	25.64	5.320	0.02503		2.538	
Kontrola	29.775	24.34	5.435		0.00986		1.000 ± 0.064
	29.49	22.89	6.600	0.01031		1.045	
	30.06	23.33	6.730	0.00942		0.955	
	COX-1	GAPDH					
Proba	30.1	33.63	-3.53		0.01225		0.271
	29.82	23.8	6.020	0.01541		2.491	
	32	25.64	6.780	0.00910		1.471	
Kontrola	31.55	24.34	7.210	0.00675	0.00619	1.092	1.000 ± 0.389
	29.81	22.89	6.920	0.00826		1.335	
	31.47	23.33	8.140	0.00354		0.573	
	COX-2	GAPDH					
Proba	32.25	33.63	-1.38		0.00359		
	32.52	23.8	8.720	0.00237			
	33.00	25.64	7.700	0.00481			
Kontrola	No Ct	24.34					
	No Ct	22.89					
	No Ct	23.33					

Tabela 9.30. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 29 (monociti)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{-ΔCt}	Srednje 2 ^{-ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	28.95	23.75	5.200	0.02720	0.02151	1.297	1.025 ± 0.271
	28.33	22.35	5.980	0.01584		0.755	
	28.00	22.28	5.540	0.02149		1.024	
Kontrola	28.57	22.32	6.250	0.01314	0.02098	0.626	1.000 ± 0.260
	30.30	25.18	5.120	0.02876		1.371	
	29.26	23.69	5.570	0.02105		1.003	
	COX-1	GAPDH					
Proba	29.67	23.75	5.92	0.01652	0.01298	2.946	2.315 ± 0.552
	28.89	22.35	6.54	0.01075		1.917	
	29.00	22.28	6.42	0.01168		2.083	
Kontrola	30.16	22.32	7.84	0.00436	0.00561	0.778	1.000 ± 0.313
	31.42	25.18	6.24				
	30.88	23.69	7.19	0.00685		1.22	
	COX-2	GAPDH					
Proba	31.34	23.75	7.59	0.00519	0.00450		
	30.66	22.35	8.31	0.00315			
	30.00	22.28	7.6	0.00515			
Kontrola	No Ct	22.32					
	No Ct	25.18					
	No Ct	23.69					

Tabela 9.31. Optimizacija uslova za praćenje produkcije PGE₂ i TXB₂ u U937 monocitima (probe 1-5)

	Površine pikova			Odnos površine pika ciljanog analita (PGE ₂ ili TXB ₂) i internog standarda (PGB ₂)		Srednja vrednost	<i>p</i>	Srednja vrednost	<i>p</i>		
	PGB ₂	PGE ₂	TXB ₂	PGE ₂ /PGB ₂	TXB ₂ /PGB ₂	PGE ₂ /PGB ₂		TXB ₂ /PGB ₂			
Proba 1	PGB ₂	PGE ₂	TXB ₂	PGE ₂ /PGB ₂	TXB ₂ /PGB ₂	PGE ₂ /PGB ₂		TXB ₂ /PGB ₂			
Proba	2346	1943	472	0.083	0.020	0.064 ±	0.211	0.018 ±	0.072		
	1528	678	232	0.044	0.015					0.027	0.003
Kontrola	4328	30	21	0.007	0.005	0.008 ±		0.005 ±			
	2969	27	8	0.009	0.003					0.002	0.002
	4031	2840	28	0.705	0.007						
Proba 2	PGB ₂	PGE ₂	TXB ₂	PGE ₂ /PGB ₂	TXB ₂ /PGB ₂	PGE ₂ /PGB ₂		TXB ₂ /PGB ₂			
Proba	2086	197	359	0.094	0.172	0.090 ±	0.000	0.094 ±	0.003		
	3624	392	511	0.108	0.141						
	3447	370	406	0.107	0.118						
	1668	88	202	0.053	0.121						
	1896	142	201	0.075	0.106						
	4281	308	435	0.072	0.102						
	5355	396	566	0.074	0.106						
	5512	414	519	0.075	0.094						
	1154	1720	644	0.149	0.056						
	1323	1651	795	0.125	0.060						
	1721	1609	731	0.093	0.042						
	9602	536	420	0.056	0.044						
	6249	560	391	0.090	0.063						
	2086	197	359	0.094	0.172						
	Kontrola	2600	0	209	0.000					0.080	0.006 ±
3023		0	89	0.000	0.029						
4527		57	365	0.013	0.081						
4628		16	326	0.003	0.070						
4328		30	21	0.007	0.005						
2969		27	8	0.009	0.003						
4031		2840	28	0.705	0.007						
3559		0	34	0.000	0.010						
5260	67	378	0.013	0.072							
Proba 3	PGB ₂	PGE ₂	TXB ₂	PGE ₂ /PGB ₂	TXB ₂ /PGB ₂	PGE ₂ /PGB ₂		TXB ₂ /PGB ₂			
Proba	1623	86	146	0.053	0.090	0.078 ±	0.000	0.072 ±	0.003		
	3421	248	328	0.072	0.096						
	2550	171	191	0.067	0.075						
	2483	185	187	0.075	0.075						
	1799	149	169	0.083	0.094						
	2494	217	187	0.087	0.075						
	3190	274	87	0.086	0.027						
	2651	227	146	0.086	0.055						
3259	311	196	0.095	0.060							
Kontrola	2562	0	95	0.000	0.037	0.003 ±		0.041 ±			
	3904	0	182	0.000	0.047						
	4399	0	133	0.000	0.030						
	3834	25	212	0.007	0.055						
	3914	28	135	0.007	0.034						
Proba 4	PGB ₂	PGE ₂	TXB ₂	PGE ₂ /PGB ₂	TXB ₂ /PGB ₂	PGE ₂ /PGB ₂		TXB ₂ /PGB ₂			
Proba	357	74	21	0.207	0.059	0.174 ±	0.012	0.060 ±	0.001		
	781	118	42	0.151	0.054						
	522	85	35	0.163	0.067						
Kontrola	614	13	4	0.021	0.007	0.060 ±		0.005 ±			
	669	32	2	0.048	0.003						
	498	36	16	0.072	0.032						
Proba 5	PGB ₂	PGE ₂	TXB ₂	PGE ₂ /PGB ₂	TXB ₂ /PGB ₂	PGE ₂ /PGB ₂		TXB ₂ /PGB ₂			
Proba	673	55	0	0.082	0.000	0.061 ±	0.570	0.020 ±	0.251		
	496	26	13	0.052	0.026						
	543	26	8	0.048	0.015						
Kontrola	321	77	2	0.240	0.006	0.047 ±		0.007 ±			
	555	17	0	0.031	0.000						
	517	33	4	0.064	0.008						

Tabela 9.32. Optimizacija uslova za praćenje produkcije PGE₂ i TXB₂ u U937 monocitima (probe 6-12)

	Površine pikova			Odnos površine pika ciljanog analita (PGE ₂ ili TXB ₂) i internog standarda (PGB ₂)		Srednja vrednost	p	Srednja vrednost	p
	PGB ₂	PGE ₂	TXB ₂	PGE ₂ /PGB ₂	TXB ₂ /PGB ₂				
Proba 6	PGB ₂	PGE ₂	TXB ₂	PGE ₂ /PGB ₂	TXB ₂ /PGB ₂	PGE ₂ /PGB ₂		TXB ₂ /PGB ₂	
Proba	422	46	12	0.109	0.028	0.095 ± 0.034	0.246	0.029 ± 0.001	0.118
	373	21	0	0.056	0.000				
	557	66	17	0.118	0.031				
Kontrola	569	112	14	0.197	0.025	0.045 ± 0.041		0.010 ± 0.013	
	485	36	0	0.074	0.000				
	477	8	2	0.017	0.004				
Proba 7	PGB ₂	PGE ₂	TXB ₂	PGE ₂ /PGB ₂	TXB ₂ /PGB ₂	PGE ₂ /PGB ₂		TXB ₂ /PGB ₂	
Proba	588		3		0.005	0.074 ± 0.001	0.241	0.018 ± 0.002	0.036
	524	39	10	0.074	0.019				
	775	57	13	0.074	0.017				
Kontrola	654	37	0	0.057	0.000	0.052 ± 0.024		0.009 ± 0.002	
	808	21	6	0.026	0.007				
	595	43	6	0.072	0.010				
Proba 8	PGB ₂	PGE ₂	TXB ₂	PGE ₂ /PGB ₂	TXB ₂ /PGB ₂	PGE ₂ /PGB ₂		TXB ₂ /PGB ₂	
Proba	9902	138	480	0.014	0.048	0.015 ± 0.003	0.211	0.048 ± 0.006	0.010
	9701	171	553	0.018	0.057				
	9346	113	361	0.012	0.039				
Kontrola	3018	36	31	0.012	0.010	0.012 ± 0.005		0.008 ± 0.003	
	2746	21	16	0.008	0.006				
	1927	33	34	0.017	0.018				
Proba 9	PGB ₂	PGE ₂	TXB ₂	PGE ₂ /PGB ₂	TXB ₂ /PGB ₂	PGE ₂ /PGB ₂		TXB ₂ /PGB ₂	
Proba	3086	1297	59	0.420	0.019	0.371 ± 0.046	0.005	0.018 ± 0.003	0.057
	3367	1215	71	0.361	0.021				
	4097	1355	59	0.331	0.014				
Kontrola	3018	36	31	0.012	0.010	0.012 ± 0.005		0.008 ± 0.003	
	2746	21	16	0.008	0.006				
	1927	33	34	0.017	0.018				
Proba 10	PGB ₂	PGE ₂	TXB ₂	PGE ₂ /PGB ₂	TXB ₂ /PGB ₂	PGE ₂ /PGB ₂		TXB ₂ /PGB ₂	
Proba	3306	1708	534	0.517	0.162	0.423 ± 0.092	0.016	0.184 ± 0.022	0.005
	3149	1319	645	0.419	0.205				
	3386	1129	626	0.333	0.185				
Kontrola	3223	44	23	0.014	0.007	0.015 ± 0.004		0.006 ± 0.001	
	2876	58	18	0.020	0.006				
	3500	43	16	0.012	0.005				
Proba 11	PGB ₂	PGE ₂	TXB ₂	PGE ₂ /PGB ₂	TXB ₂ /PGB ₂	PGE ₂ /PGB ₂		TXB ₂ /PGB ₂	
Proba	717	180	43	0.251	0.060	0.234 ± 0.017	0.001	0.045 ± 0.013	0.039
	907	196	36	0.216	0.040				
	722	169	25	0.234	0.035				
Kontrola	654	37	0	0.057	0.000	0.064 ± 0.011		0.006 ± 0.002	
	808	21	6	0.026	0.007				
	595	43	6	0.072	0.010				
Proba 12	PGB ₂	PGE ₂	TXB ₂	PGE ₂ /PGB ₂	TXB ₂ /PGB ₂	PGE ₂ /PGB ₂		TXB ₂ /PGB ₂	
Proba	8494	2796	399	0.329	0.047	0.355 ± 0.045	0.000	0.047 ± 0.008	0.001
	9597	3156	449	0.329	0.047				
	7970	3086	316	0.387	0.040				
	9409	3847	296	0.409	0.031				
	9738	3994	380	0.410	0.039				
	8929	3590	479	0.402	0.054				
	9690	4112	511	0.424	0.053				
	8549	2759	386	0.323	0.045				
	1028	3588	511	0.349	0.050				
	9431	2819	425	0.299	0.045				
	1098	3373	562	0.307	0.051				
	1104	3814	473	0.345	0.043				
	9216	2803	596	0.304	0.065				
Kontrola	3018	36	31	0.012	0.010	0.012 ± 0.005		0.011 ± 0.006	
	2746	21	16	0.008	0.006				
	1927	33	34	0.017	0.018				

Tabela 9.33. Optimizacija uslova za praćenje produkcije PGE₂ i TXB₂ u U937 monocitima (proba 13)

Proba 13	Površine pikova			Odnos površine pika ciljanog analita (PGE ₂ ili TXB ₂) i internog standarda (PGB ₂)		Srednja vrednost	<i>p</i>	Srednja vrednost	<i>p</i>
	PGB ₂	PGE ₂	TXB ₂	PGE ₂ /PGB ₂	TXB ₂ /PGB ₂	PGE ₂ /PGB ₂		TXB ₂ /PGB ₂	
Proba	2464	509	79	0.207	0.032	0.102 ± 0.033	0.000	0.039 ± 0.005	0.000
	5453	1029	188	0.189	0.034				
	4046	346	175	0.086	0.043				
	3776	332	175	0.088	0.046				
	3866	339	146	0.088	0.038				
	3878	281	160	0.072	0.041				
	3628	271	117	0.075	0.032				
	3790	408	172	0.108	0.045				
	4111	425	148	0.103	0.036				
	4400	461	168	0.105	0.038				
	4564	467	201	0.102	0.044				
Kontrola	5102	49	82	0.010	0.016	0.009 ± 0.002	0.000	0.015± 0.005	0.000
	5181	42	77	0.008	0.015				
	7371	93	146	0.013	0.020				
	7535	72	157	0.010	0.021				
	4546	36	49	0.008	0.011				
	4502	29	40	0.006	0.009				

9.1.2. Optimizacija metode na makrofagama

Tabela 9.34. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 1 (makrofage)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>	
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost		
Proba	23.77	17.14	6.630	0.01010	0.00877	1.732	1.708 ± 0.033	0.000
	23.9	17.23	6.670	0.00982		1.685		
	25.82	18.53	7.290	0.00639		1.096		
Kontrola	25.51	18.15	7.360	0.00609	0.00583	1.044	1.000 ± 0.045	
	25.68	18.19	7.490	0.00556		0.954		
	25.95	18.53	7.420	0.00584		1.002		
	COX-1	GAPDH						
Proba	23.24	17.14	6.100	0.01458	0.02003	0.411	0.441 ± 0.043	0.002
	23.13	17.23	5.900	0.01675		0.472		
	23.65	18.53	5.120	0.02876		0.810		
Kontrola	22.89	18.15	4.740	0.03742	0.03551	1.054	1.000 ± 0.048	
	23.03	18.19	4.840	0.03492		0.983		
	23.4	18.53	4.870	0.03420		0.963		
	COX-2	GAPDH						
Proba	19.98	17.14	2.840	0.13966	0.13595	2.103	2.047 ± 0.097	0.001
	20.07	17.23	2.840	0.13966		2.103		
	21.49	18.53	2.960	0.12851		1.935		
Kontrola	22.01	18.15	3.860	0.06887	0.06640	1.037	1.000 ± 0.038	
	22.16	18.19	3.970	0.06381		0.961		
	22.44	18.53	3.910	0.06652		1.002		

Tabela 9.35. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 2 (makrofage)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>	
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost		
Proba	25.3	18.23	7.070	0.00744	0.00798	1.358	1.455 ± 0.122	0.027
	24.68	17.84	6.840	0.00873		1.592		
	25.23	18.22	7.010	0.00776		1.415		
Kontrola	25.33	17.92	7.410	0.00588	0.00548	1.073	1.000 ± 0.103	
	25.41	17.79	7.620	0.00508		0.927		
	26.69	No Ct						
	COX-1	GAPDH						
Proba	24.25	18.23	6.020	0.01541	0.01925	0.662	0.827 ± 0.188	0.249
	23.22	17.84	5.380	0.02401		1.031		
	23.99	18.22	5.770	0.01833		0.787		
Kontrola	23.31	17.92	5.390	0.02385	0.02328	1.024	1.000 ± 0.034	
	23.25	17.79	5.460	0.02272		0.976		
	No Ct	No Ct						
	COX-2	GAPDH						
Proba	20.1	18.23	1.870	0.27357	0.31975	2.470	2.887 ± 0.520	0.014
	19.22	17.84	1.380	0.38422		3.470		
	19.95	18.22	1.730	0.30145		2.722		
Kontrola	20.9	17.92	2.980	0.12674	0.11074	1.145	1.000 ± 0.204	
	21.19	17.79	3.400	0.09473		0.855		
	22.44	No Ct						

Tabela 9.36. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 3 (makrofage)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	23.45	18.8	4.650	0.03983	0.02924	2.332	0.163
	25.48	20.32	5.160	0.02797		1.638	
	25.19	19.54	5.650	0.01992		1.166	
Kontrola	23.77	17.65	6.120	0.01438	0.01708	0.842	1.000 ± 0.224
	30.19	26.29	3.900				
	24.32	18.66	5.660	0.01978		1.158	
	COX-1	GAPDH					
Proba	25.27	18.8	6.470	0.01128	0.01144	0.265	0.153
	26.57	20.32	6.250	0.01314		0.309	
	26.2	19.54	6.660	0.00989		0.232	
Kontrola	24.82	17.65	7.170		0.04254		1.000 ± 0.262
	30.6	26.29	4.310	0.05042		1.185	
	23.51	18.66	4.850	0.03467		0.815	
	COX-2	GAPDH					
Proba	20.84	18.8	2.040	0.24316	0.21606	43.05	0.004
	22.57	20.32	2.250	0.21022		37.22	
	21.9	19.54	2.360	0.19479		34.49	
Kontrola	25.63	17.65	7.980	0.00396	0.00565	0.701	1.000 ± 0.268
	33.65	26.29	7.360	0.00609		1.078	
	25.84	18.66	7.180	0.00690		1.221	

Tabela 9.37. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 4 (makrofage)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	24.33	19.64	4.690	0.03874	0.05333	2.115	0.238
	23.23	19.35	3.880	0.06792		3.708	
Kontrola	24.47	18.68	5.790	0.01807	0.01832	0.987	1.000 ± 0.314
	25.11	18.81	6.300	0.01269		0.693	
	COX-1	GAPDH					
Proba	25.88	19.64	6.240	0.01323	0.01487	0.700	0.284
	25.27	19.35	5.920	0.01652		0.874	
Kontrola	24.25	18.68	5.570	0.02105	0.01890	1.114	1.000 ± 0.161
	24.71	18.81	5.900	0.01675		0.886	
	COX-2	GAPDH					
Proba	19.96	19.64	0.320	0.80107	0.71697	114.82	0.075
	20.01	19.35	0.660	0.63288		90.71	
Kontrola	25.99	18.68	7.310	0.00630	0.00698	0.903	1.000 ± 0.137
	26.51	18.81	7.700				
						1.097	

Tabela 9.38. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 5 (makrofage)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	25.3	19.37	5.93	0.01640	0.02084	2.196	0.201
	25.59	19.69	5.9	0.01675		2.242	
	24.73	19.64	5.09	0.02936			
Kontrola	26.01	19.43	6.58	0.01045	0.00747	1.399	1.000 ± 0.565
	27.56	19.76	7.8	0.00449		0.601	
	No Ct	35.46					
	COX-1	GAPDH					
Proba	24.47	19.37	5.100	0.02916	0.03974	0.877	0.550
	24.58	19.69	4.890	0.03373		1.014	
	23.79	19.64	4.150	0.05633		1.694	
Kontrola	24.15	19.43	4.720	0.03794	0.03325	1.141	1.000 ± 0.200
	24.89	19.76	5.130	0.02856		0.859	
	37.19	35.46	1.730				
	COX-2	GAPDH					
Proba	21.73	19.37	2.360	0.19479	0.28287	8.229	0.009
	21.72	19.69	2.030	0.24486		10.344	
	20.93	19.64	1.290	0.40895		17.276	
Kontrola	24.34	19.43	4.910	0.03326	0.02367	1.405	1.000 ± 0.573
	25.91	19.76	6.150	0.01408		0.595	
	No Ct	35.46					

Tabela 9.39. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 6 (makrofage)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	24.59	18.96	5.630	0.02019	0.01817	3.066	0.026
	24.22	18.76	5.460	0.02272		3.449	
	25.4	18.97	6.430	0.01160			
Kontrola	25.36	18.27	7.090	0.00734	0.00659	1.114	1.000 ± 0.144
	25.74	18.24	7.500	0.00552		0.839	
	25.53	18.35	7.180	0.00690		1.047	
	COX-1	GAPDH					
Proba	25.39	18.96	6.430	0.01160	0.01370	0.727	0.440
	24.61	18.76	5.850	0.01734		1.087	
	25.33	18.97	6.360	0.01217		0.763	
Kontrola	23.95	18.27	5.680	0.01951	0.01595	1.223	1.000 ± 0.205
	24.5	18.24	6.260	0.01305		0.818	
	24.38	18.35	6.030	0.01530		0.959	
	COX-2	GAPDH					
Proba	20.81	18.96	1.850	0.27739	0.28351	14.594	0.024
	20.24	18.76	1.480	0.35849		18.860	
	21.19	18.97	2.220	0.21464		11.292	
Kontrola	23.84	18.27	5.570	0.02105	0.01901	1.107	1.000 ± 0.221
	24.38	18.24	6.140	0.01418		0.746	
	23.87	18.35	5.520	0.02179		1.147	

Tabela 9.40. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 7 (makrofage)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	22.78	19.52	3.260	0.10439	0.12231	4.242	0.007
	22.61	19.64	2.970	0.12763		5.186	
	22.11	19.22	2.890	0.13490		5.482	
Kontrola	23.69	18.51	5.180	0.02758	0.02461	1.121	1.000 ± 0.107
	23.35	17.88	5.470	0.02256		0.917	
	24.22	18.82	5.400	0.02368		0.962	
	COX-1	GAPDH					
Proba	26.77	19.52	7.250	0.00657	0.00773	0.414	0.002
	26.39	19.64	6.750	0.00929		0.585	
	26.31	19.22	7.090	0.00734		0.462	
Kontrola	24.34	18.51	5.830	0.01758	0.01589	1.106	1.000 ± 0.093
	23.92	17.88	6.040	0.01520		0.957	
	24.89	18.82	6.070	0.01488		0.937	
	COX-2	GAPDH					
Proba	20.57	19.52	1.050	0.48297	0.69066	38.09	0.024
	20.07	19.64	0.430	0.74226		58.54	
	19.46	19.22	0.240	0.84675		66.78	
Kontrola	24.66	18.51	6.150	0.01408	0.01268	1.111	1.000 ± 0.172
	24.06	17.88	6.180	0.01379		1.088	
	25.44	18.82	6.620	0.01017		0.802	

Tabela 9.41. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 8 (makrofage)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	25.64	21.92	3.720	0.07589	0.09557	3.042	0.037
	25.52	22.02	3.500	0.08839		3.543	
	24.21	21.18	3.030	0.12243		4.907	
Kontrola					0.02495		1.000 ± 0.025
	26.82	21.52	5.300	0.02538		1.017	
	25.49	20.14	5.350	0.02452		0.983	
	COX-1	GAPDH					
Proba	27.58	21.92	5.660	0.01978	0.02061	0.764	0.412
	27.7	22.02	5.680	0.01951		0.754	
	26.65	21.18	5.470	0.02256		0.872	
Kontrola					0.02588		1.000 ± 0.224
	27.04	21.52	5.520	0.02179		0.842	
	25.2	20.14	5.060	0.02998		1.158	
	COX-2	GAPDH					
Proba	24.63	21.92	2.710	0.15283		6.733	0.041
	24.41	22.02	2.390	0.19078		8.404	
	22.94	21.18	1.760	0.29525		13.006	
Kontrola					0.02270		1.000 ± 0.601
	27.78	21.52	6.260	0.01305		0.575	
	25.09	20.14	4.950	0.03235		1.425	

Tabela 9.21. Promena ekspresije cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK pri uslovima prikazanim u Probi 9 (makrofage)

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Proba	23.18	20.45	2.730	0.15073	0.13186	7.295	6.382 ± 1.053
	23.39	20.52	2.870	0.13679		6.621	
	23.91	20.7	3.210	0.10807		5.231	
Kontrola	26.09	20.26	5.830	0.01758	0.02066	0.851	1.000 ± 0.166
	25.21	19.85	5.360	0.02435		1.179	
	25.19	19.55	5.640	0.02005		0.971	
	COX-1	GAPDH					
Proba	26.47	20.67	5.800	0.01795	0.01226	1.121	0.766 ± 0.336
	26.68	20.25	6.430	0.01160		0.724	
	27.42	20.31	7.110	0.00724		0.452	
Kontrola	26.26	19.91	6.350	0.01226	0.01601	0.766	1.000 ± 0.205
	25.37	19.6	5.770	0.01833		1.144	
	25.53	19.69	5.840	0.01746		1.090	
	COX-2	GAPDH					
Proba	20.97	20.45	0.520	0.69737	0.59275	12.193	10.36 ± 1.668
	21.49	20.52	0.970	0.51051		8.926	
	21.51	20.7	0.810	0.57038		9.973	
Kontrola	24.75	20.26	4.490	0.04450	0.05719	0.778	1.000 ± 0.246
	23.64	19.85	3.790	0.07229		1.264	
	23.74	19.55	4.190	0.05479		0.958	
	mPGES-1	GAPDH					
Proba	33.4	20.45	12.95	0.00013	0.00009	3.520	3.150 ± 0.523
	33.81	20.52	13.29	0.00010		2.781	
	34.95	20.7	14.25	0.00005		1.430	
Kontrola	35.18	20.26	14.92	0.00003	0.00004	0.898	1.000 ± 0.129
	34.42	19.85	14.57	0.00004		1.145	
	34.38	19.55	14.83	0.00003		0.956	
	mPGES-2	GAPDH					
Proba	27.08	20.45	6.630	0.01010	0.01079	1.225	1.310 ± 0.098
	26.94	20.52	6.420	0.01168		1.417	
	27.26	20.7	6.560	0.01060		1.286	
Kontrola	27.33	20.26	7.070	0.00744	0.00824	0.903	1.000 ± 0.121
	26.59	19.85	6.740	0.00936		1.135	
	26.53	19.55	6.980	0.00792		0.961	
	TXAS	GAPDH					
Proba	24.03	20.45	3.580	0.08362	0.08248	1.225	1.208 ± 0.022
	24.11	20.52	3.590	0.08304		1.217	
	24.33	20.7	3.630	0.08077		1.183	
Kontrola	24.18	20.26	3.920	0.06606	0.06825	0.968	1.000 ± 0.122
	23.54	19.85	3.690	0.07748		1.135	
	23.58	19.55	4.030	0.06121		0.897	

Tabela 9.43. Optimizacija uslova za praćenje produkcije PGE₂ i TXB₂ u U937 makorfaagama

	Površine pikova			Odnos površine pika ciljanog analita (PGE ₂ ili TXB ₂) i internog standarda (PGB ₂)		Srednja vrednost	p	Srednja vrednost	p
	PGB ₂	PGE ₂	TXB ₂	PGE ₂ /PGB ₂	TXB ₂ /PGB ₂				
Proba 1	PGB ₂	PGE ₂	TXB ₂	PGE ₂ /PGB ₂	TXB ₂ /PGB ₂	PGE ₂ /PGB ₂		TXB ₂ /PGB ₂	
Proba	704	62	33	0.088	0.047	0.079 ±	0.388	0.070 ±	0.205
	845	59	79	0.070	0.093	0.013		0.033	
Kontrola	798	87	0	0.109	0.000	0.096 ±		0.000 ±	
	740	62	0	0.084	0.000	0.018		0.000	
Proba 2	PGB ₂	PGE ₂	TXB ₂	PGE ₂ /PGB ₂	TXB ₂ /PGB ₂	PGE ₂ /PGB ₂		TXB ₂ /PGB ₂	
Proba	917	90	58	0.098	0.063	0.136 ±	0.253	0.046 ±	0.234
	770	134	22	0.174	0.029	0.054		0.025	
Kontrola	529	21	0	0.040	0.000	0.059 ±		0.000 ±	
	785	61	0	0.078	0.000	0.027		0.000	
Proba 3	PGB ₂	PGE ₂	TXB ₂	PGE ₂ /PGB ₂	TXB ₂ /PGB ₂	PGE ₂ /PGB ₂		TXB ₂ /PGB ₂	
Proba	736	110	28	0.149	0.038	0.181 ±	0.388	0.056 ±	0.031
	758	177	58	0.234	0.077				
	923	147	49	0.159	0.053				
Kontrola	476	32	0	0.067	0.000	0.051 ±		0.004 ±	
	746	33	10	0.044	0.013				
	688	29	0	0.042	0.000				
Proba 4	PGB ₂	PGE ₂	TXB ₂	PGE ₂ /PGB ₂	TXB ₂ /PGB ₂	PGE ₂ /PGB ₂		TXB ₂ /PGB ₂	
Proba	612	200	105	0.327	0.172	0.332 ±	0.008	0.180 ±	0.042
	688	184	129	0.267	0.188				
	486	195	156	0.401	0.321				
Kontrola	551	79	0	0.143	0.004	0.059 ±		0.000 ±	
	450	24	0	0.053	0.000				
	369	24	0	0.065	0.000				
Proba 5	PGB ₂	PGE ₂	TXB ₂	PGE ₂ /PGB ₂	TXB ₂ /PGB ₂	PGE ₂ /PGB ₂		TXB ₂ /PGB ₂	
Proba	380	144	61	0.379	0.161	0.398 ±	0.009	0.149 ±	0.002
	513	239	74	0.466	0.144				
	837	291	118	0.348	0.141				
Kontrola	960	31	6	0.032	0.006	0.027 ±		0.006 ±	
	972	26	4	0.027	0.004				
	887	20	6	0.023	0.007				
Proba 6	PGB ₂	PGE ₂	TXB ₂	PGE ₂ /PGB ₂	TXB ₂ /PGB ₂	PGE ₂ /PGB ₂		TXB ₂ /PGB ₂	
Proba	4046	2919	51	0.721	0.013	0.808 ±	0.004	0.033 ±	0.205
	3906	3487	127	0.893	0.033				
	3637	2946	120	0.810	0.033				
Kontrola	2897	49	30	0.017	0.010	0.010 ±		0.009 ±	
	2702	24	29	0.009	0.011				
	3318	9	21	0.003	0.006				
Proba 7	PGB ₂	PGE ₂	TXB ₂	PGE ₂ /PGB ₂	TXB ₂ /PGB ₂	PGE ₂ /PGB ₂		TXB ₂ /PGB ₂	
Proba	3052	1280	291	0.419	0.095	0.535 ±	0.013	0.125 ±	0.003
	3647	2300	480	0.631	0.132				
	3266	1811	387	0.555	0.118				
Kontrola	3227	10	49	0.003	0.015	0.007 ±		0.028 ±	
	3468	24	116	0.007	0.033				
	3046	35	105	0.011	0.034				

9.2. Određivanje subtoksičnih koncentracija ispitivanih ekstrakata bokvica, uzoraka vina, standardnih i sintetskih jedinjenja

Tabela 9.44. Rezultati ispitivanja citotoksičnog delovanja ekstrakata bokvica

	radna c ($\mu\text{g/mL}$)	Broj ćelija $\times 10^4$ ćelija/mL						Procenat vijabilnih ćelija u radnim probama			Procenat (%) vijabilnih ćelija (proba/kontrola)			
		Proba 1		Proba 2		Proba 3		1	2	3	1	2	3	Srednja vrednost
		vijabilne	ukupne	vijabilne	ukupne	vijabilne	ukupne							
PALM	500	101	126	107	133	140	172	80.16	80.45	81.40	99.2	99.55	100.7	99.82 \pm 0.800
Kontrola		134	170	124	146	133	169	78.82	84.93	78.70	97.53	105.1	97.38	100.0 \pm 4.409
PALV	500	131	158	136	167	100	146	82.91	81.44	68.49	105.4	103.5	87.07	98.67 \pm 10.08
Kontrola		54	68	94	117	93	122	79.41	80.34	76.23	101.0	102.1	96.91	100.0 \pm 2.742
PARM	500	139	171	144	180	128	155	81.29	80.00	82.58	100.6	98.99	102.2	100.6 \pm 1.597
Kontrola		134	170	124	146	133	169	78.82	84.93	78.70	97.53	105.1	97.38	100.0 \pm 4.409
PARV	500	140	165	160	196	125	152	84.85	81.63	82.24	105	101.0	101.8	102.6 \pm 2.115
Kontrola		134	170	124	146	133	169	78.82	84.93	78.70	97.53	105.1	97.38	100.0 \pm 4.409
PHOM	500	88	119	100	124	96	109	73.95	80.65	88.07	94.01	102.5	112.0	102.8 \pm 8.982
Kontrola		54	68	94	117	93	122	79.41	80.34	76.23	101.0	102.1	96.91	100.0 \pm 2.742
PHOV	500	112	129	98	118	119	140	86.82	83.05	85.00	110.4	105.6	108.1	108.0 \pm 2.397
Kontrola		54	68	94	117	93	122	79.41	80.34	76.23	101.0	102.1	96.91	100.0 \pm 2.742
PLAM	500	127	158	156	203	120	144	80.38	76.85	83.33	99.46	95.09	103.1	99.22 \pm 4.018
Kontrola		134	170	124	146	133	169	78.82	84.93	78.70	97.53	105.1	97.38	100.0 \pm 4.409
PLAV	500	105	130	154	195	156	198	80.77	78.97	78.79	99.94	97.72	97.49	98.38 \pm 1.354
Kontrola		134	170	124	146	133	169	78.82	84.93	78.70	97.53	105.1	97.38	100.0 \pm 4.409
PMAM	500	125	149	139	179	120	155	83.89	77.65	77.42	103.8	96.08	95.79	98.56 \pm 4.543
Kontrola		134	170	124	146	133	169	78.82	84.93	78.70	97.53	105.1	97.38	100.0 \pm 4.409
PMAV	500	148	172	130	154	135	156	86.05	84.42	86.54	109.4	107.3	110.0	108.9 \pm 1.413
Kontrola		54	68	94	117	93	122	79.41	80.34	76.23	101.0	102.1	96.91	100.0 \pm 2.742
PMEM	500	102	110	93	108	98	109	92.73	86.11	89.91	117.9	109.5	114.3	113.9 \pm 4.4221
Kontrola		54	68	94	117	93	122	79.41	80.34	76.23	101.0	102.1	96.91	100.0 \pm 2.742
PMEV	500	106	130	129	156	125	149	81.54	82.69	83.89	103.7	105.1	106.7	105.1 \pm 1.496
Kontrola		54	68	94	117	93	122	79.41	80.34	76.23	101.0	102.1	96.91	100.0 \pm 2.742

Tabela 9.45. Rezultati ispitivanja citotoksičnog delovanja vina

	radna c ($\mu\text{g/mL}$)	Broj ćelija $\times 10^4$ ćelija/mL						Procenat vijabilnih ćelija u probama			Procenat (%) vijabilnih ćelija (proba/kontrola)			
		Proba 1		Proba 2		Proba 3		1	2	3	1	2	3	Srednja vrednost
		vijabilne	ukupne	vijabilne	ukupne	vijabilne	ukupne							
M1	150	233	258	277	310	233	265	90.23	89.53	87.78	103.7	102.9	100.9	102.5 \pm 1.450
Kontrola		197	222	181	208	186	218	88.65	87.28	85.16	101.9	100.29	97.85	100.0 \pm 2.017
M2	150	124	151	145	157	170	182	82.12	92.36	93.41	91.47	102.9	104.0	99.46 \pm 6.946
Kontrola		222	253	198	220	185	202	87.75	90.00	91.58	97.74	100.2	102.0	100.0 \pm 2.184
M3	150	157	185	163	185	210	238	85.06	88.31	88.38	97.74	101.5	101.6	100.3 \pm 2.178
Kontrola		197	222	181	208	186	218	88.65	87.28	85.16	101.9	100.29	97.85	100.0 \pm 2.017
M4	150	277	316	156	161	182	195	87.66	96.89	93.33	93.35	103.2	99.40	98.65 \pm 4.961
Kontrola		157	165	138	149	125	133	95.15	92.62	93.98	101.3	98.6	100.1	100.0 \pm 1.351
M5	150	75	86	218	247	159	190	87.21	88.26	83.68	97.14	98.31	93.21	96.22 \pm 2.669
Kontrola		222	253	198	220	185	202	87.75	90.00	91.58	97.74	100.2	102.0	100.0 \pm 2.184
M6	150	173	193	139	159	191	214	89.64	87.42	89.25	99.84	97.38	99.42	98.88 \pm 1.319
Kontrola		222	253	198	220	185	202	87.75	90.00	91.58	97.74	100.2	102.0	100.0 \pm 2.184
M7	150	140	166	198	214	170	200	84.34	92.52	85.00	93.94	103.1	94.68	97.23 \pm 5.065
Kontrola		222	253	198	220	185	202	87.75	90.00	91.58	97.74	100.2	102.0	100.0 \pm 2.184
M8	150	155	197	107	128	178	201	78.68	83.59	88.56	91.93	97.67	103.46	100.6 \pm 5.770
Kontrola		222	253	198	220	185	202	87.75	90.00	91.58	97.74	100.2	102.0	100.0 \pm 2.184
M9	150	201	216	162	178	130	141	93.06	91.01	92.20	105.0	102.6	104.0	103.9 \pm 1.158
Kontrola		211	239	176	197	281	318	88.28	89.34	88.36	99.57	100.8	99.66	100.0 \pm 0.663
M10	150	140	157	173	186	147	164	89.17	93.01	89.63	100.57	104.9	101.10	102.2 \pm 2.364
Kontrola		211	239	176	197	281	318	88.28	89.34	88.36	99.57	100.8	99.66	100.0 \pm 0.663
M11	150	179	197	178	191	149	163	90.86	93.19	91.41	102.5	105.1	103.1	103.6 \pm 1.374
Kontrola		211	239	176	197	281	318	88.28	89.34	88.36	99.57	100.8	99.66	100.0 \pm 0.663
M12	150	134	148	134	140	92	95	90.54	95.71	96.84	96.42	101.9	103.1	100.5 \pm 3.579
Kontrola		157	165	138	149	125	133	95.15	92.62	93.98	101.3	98.63	100.1	100.0 \pm 1.351
MFRA	150	103	169	73	116	77	123	61.21	62.89	62.59	105.1	108.0	107.5	106.8 \pm 1.537
Kontrola		56	128	116	188	70	127	44.24	61.78	54.72	75.94	106.1	93.9	100.0 \pm 8.578
MITA	150	101	153	86	140	88	143	65.82	61.54	61.22	113.0	105.6	105.1	107.9 \pm 4.408
Kontrola		56	128	116	188	70	127	44.24	61.78	54.72	75.94	106.1	93.9	100.0 \pm 8.578
MMA	150	84	151	221	298	174	229	55.56	74.19	75.92	78.15	104.4	106.8	105.6 \pm 1.714
Kontrola		86	142	161	211	185	240	60.13	76.14	77.00	84.58	107.1	108.3	100.0 \pm 13.37
MSL	150	79	136	77	126	88	146	57.96	60.95	60.49	99.51	104.6	103.9	102.7 \pm 2.762
Kontrola		56	128	116	188	70	127	44.24	61.78	54.72	75.94	106.1	93.9	100.0 \pm 8.578
MSP	150	130	208	181	246	198	247	62.43	73.66	80.10	87.82	103.6	112.7	108.1 \pm 6.404
Kontrola		86	142	161	211	185	240	60.13	76.14	77.00	84.58	107.1	108.3	100.0 \pm 13.37

Tabela 9.46. Rezultati ispitivanja citotoksičnog delovanja apigenina, apigenin-7-O-glukoziida i apigenin-7-O-glukuronida

	radna c μmol/L	Broj ćelija × 10 ⁴ ćelija/mL						Procenat vijabilnih ćelija u probama			Procenat (%) vijabilnih ćelija (proba/kontrola)			
		Proba 1		Proba 2		Proba 3		1	2	3	1	2	3	Srednja vrednost
Apigenin	100	5	84	9	100	13	116	5.714	8.982	11.34	6.990	10.99	13.87	10.62 ± 3.456
Kontrola		114	150	123	145	119	140	76.00	84.71	84.62	96.33	103.6	103.5	101.2 ± 4.176
Apigenin	50	10	98	52	108	2	36	9.756	47.78	6.67	11.93	58.44	8.155	10.04 ± 2.672
Kontrola		114	150	123	145	119	140	76.00	84.71	84.62	96.33	103.6	103.5	101.2 ± 4.176
Apigenin	25	63	127	86	148	72	137	49.29	58.33	52.63	57.60	68.16	61.50	62.42 ± 5.342
Kontrola		164	193	164	192	152	178	85.31	85.63	85.81	99.68	100.1	100.3	100.0 ± 0.299
Apigenin	25	53	106	51	160	54	110	50.00	31.88	49.09	58.33	37.19	57.27	57.80 ± 0.750
Kontrola		137	161	137	160	127	148	85.09	85.63	85.81	99.27	99.89	100.1	100.0 ± 0.435
Apigenin	15	2	64	88	119	26	62	3.13	73.95	41.94	4.093	96.85	54.92	75.89 ± 29.65
Kontrola		98.5	142	90	119	107	127	69.4	75.6	84.3	90.77	98.97	110.3	100.0 ± 9.781
Apigenin	15	2	64	88	119	27	62	0.000	73.95	43.55	0.000	87.27	51.39	69.33 ± 25.37
Kontrola		0	61	116	132	102	125	16.02	87.88	81.60	19.31	103.7	96.30	100.0 ± 5.674
Apigenin	10	67	94	64	95	73	99	71.28	67.37	73.74	93.35	88.24	96.58	92.72 ± 5.898
Kontrola		98.5	142	90	119	107	127	69.4	75.6	84.3	90.77	98.97	110.3	100.0 ± 9.781
Apigenin	10	66	92	67	96	73	100	71.35	69.79	73.00	84.20	82.36	86.15	84.24 ± 1.893
Kontrola		10	61	116	132	102	125	16.39	87.88	81.60	19.35	103.7	96.30	100.0 ± 5.239
Apigenin	5	92	113	80	101	88	130	81.91	79.76	67.59	92.94	90.50	76.69	86.71 ± 8.763
Kontrola		142	160	114	128	151	174	88.72	88.79	86.90	100.7	100.7	98.60	100.0 ± 1.217
Apigenin	5	28	40	42	54	20	34	70.00	77.78	58.82	84.48	93.87	70.99	83.11 ± 11.50
Kontrola		61	72	80	125	95	115	84.72	64.00	82.61	101.3	76.50	98.74	100.0 ± 1.363
Apigenin	5	56	66	125	153	141	168	84.85	81.70	83.93	96.55	92.97	95.50	95.01 ± 1.843
Kontrola		117	132	94	108	117	133	88.64	87.04	87.97	100.9	99.0	100.1	100.0 ± 0.914
Apigenin	5	173	255	370	513	116	161	67.84	72.12	72.05	88.60	94.20	94.10	92.30 ± 3.201
Kontrola		71	118	134	176	154	200	60.13	76.14	77.00	78.53	99.44	100.6	100.0 ± 12.41
Apigenin	2.5	68	76	82.5	91.2	61	78	89.47	90.46	78.21	101.8	102.9	88.99	97.91 ± 7.748
Kontrola		117	132	94	108	117	133	88.64	87.04	87.97	100.9	99.04	100.1	100.0 ± 0.914
Apigenin-7-O-glukoziid	50	108	134	107	139	150	181	80.36	76.72	82.78	98.30	93.85	101.3	97.80 ± 3.729
Kontrola		114	150	123	145.2	118.8	140.4	76.00	84.71	84.62	96.33	103.6	103.5	101.2 ± 4.176
Apigenin-7-O-glukuronid	25	92	110	79	112	112	131	83.64	70.54	85.50	98.32	82.92	100.5	99.41 ± 1.546

Tabela 9.47. Rezultati ispitivanja citotoksičnog delovanja luteolina, luteolina-7-O-glukozi i luteolin-7-O-glukuronida

	radna c μmol/L	Broj ćelija × 10 ⁴ ćelija/mL						Procenat vijabilnih ćelija u probama			Procenat (%) vijabilnih ćelija (proba/kontrola)			
		Proba 1		Proba 2		Proba 3		1	2	3	1	2	3	Srednja vrednost
Luteolin	50	8	118	4	176	4	200	6.751	2.273	2.000	8.817	2.968	2.612	4.799 ± 3.484
Kontrola		71	118	134	176	154	200	60.13	76.14	77.00	78.53	99.44	100.6	100.0 ± 12.41
Luteolin	25	3	118	2	176	6	200	2.532	1.136	3.000	3.306	1.484	3.918	2.903 ± 1.266
Kontrola		71	118	134	176	154	200	60.13	76.14	77.00	78.53	99.44	100.6	100.0 ± 12.41
Luteolin	15	2	43	7	48	2.5	47	4.651	14.58	5.312	6.092	19.10	6.967	10.02 ± 7.271
Kontrola		99	142	90	119	107	127	69.37	75.63	84.25	90.77	98.97	110.2	100.0 ± 9.781
Luteolin	10	10	45	12	51	16	55	22.22	23.53	29.09	29.11	30.82	38.10	32.67 ± 4.777
Kontrola		99	142	90	119	107	127	69.37	75.63	84.25	90.77	98.97	110.3	100.0 ± 9.781
Luteolin	10	10	44	12	51	16	55	22.73	23.53	29.09	26.82	27.77	34.33	29.64 ± 4.090
Kontrola		1	61	116	132	102	125	16.02	87.88	81.60	19.31	103.7	96.30	100.0 ± 5.674
Luteolin	5	51	88	83	130	8	40	58.22	63.89	21.21	66.06	72.49	24.07	54.21 ± 4.549
Kontrola		141	160	114	129	151	174	88.35	88.79	86.90	100.4	100.9	98.74	100.0 ± 1.123
Luteolin	5	16	25	2	8	4	17	64.00	25.00	23.53	77.24	30.17	28.40	45.27 ± 27.70
Kontrola		61	72	80	125	95	115	84.72	64.00	82.61	109.9	83.00	107.1	100.0 ± 14.79
Luteolin	5	65	130	57	113	35	78	50.00	50.44	44.87	56.90	57.40	51.06	55.12 ± 3.523
Kontrola		117	132	94	108	117	133	88.64	87.04	87.97	100.9	99.04	100.1	100.0 ± 0.914
Luteolin	5	130	170	117	169	95	130	76.47	69.23	73.08	99.87	90.42	95.44	95.24 ± 4.731
Kontrola		71	118	134	176	154	200	60.13	76.14	77.00	78.53	99.44	100.6	100.0 ± 12.41
Luteolin	2.5	111	128	223	252	102	112	86.72	88.49	91.07	98.68	100.7	103.6	101.0 ± 2.491
Kontrola		117	132	94	108	117	133	88.64	87.04	87.97	100.9	99.04	100.1	100.0 ± 0.914
Luteolin-7-O-glukozid	25	131	150	119	151	111	143	87.33	78.81	77.62	105.4	95.11	93.68	98.06 ± 6.394
Kontrola		123	141	142	166	157	180	87.23	85.54	87.22	100.7	98.70	100.6	100.0 ± 1.123
Luteolin-7-O-glukuronid	25	88	111	63	82	72	87	79.28	76.83	82.76	93.20	90.32	97.29	95.24 ± 2.892
Kontrola		88.5	100	101	121	114	133	88.50	83.47	85.71	103.0	97.18	99.79	100.0 ± 2.933

Tabela 9.48. Rezultati ispitivanja citotoksičnog delovanja odabranih flavonoida - flavonola i flavan-3-ola

	radna c μmol/L	Broj ćelija × 10 ⁴ ćelija/mL						Procenat vijabilnih ćelija u probama			Procenat (%) vijabilnih ćelija (proba/kontrola)			
		Proba 1		Proba 2		Proba 3		1	2	3	1	2	3	Srednja vrednost
Epikatehin	100	197	244	177	238	161	201	80.74	74.37	80.10	99.88	92.01	99.09	96.99 ± 4.338
Kontrola		175	215	185	229	204	254	81.40	80.79	80.31	100.7	99.9	99.4	100.0 ± 0.670
Epikatehin	50	119	164	131	176	113	146	72.56	74.43	77.40	95.04	97.49	101.4	97.96 ± 3.194
Kontrola		128	164	122	166	141	182	78.05	73.49	77.47	102.2	96.3	101.5	100.0 ± 3.25
Katehin	50	160	197	167	193	450	496	81.10	86.34	90.80	93.18	99.20	104.3	98.90 ± 5.579
Kontrola		197	222	181	208	186	218	88.65	87.28	85.16	101.9	100.3	97.9	100.0 ± 2.017
Kvercetin	100	17	56	16	61	14	47	30.36	26.23	29.79	32.33	27.93	31.72	30.66 ± 2.382
Kontrola		157	165	138	149	125	133	95.15	92.62	93.98	101.3	98.6	100.1	100.0 ± 1.351
Kvercetin	50	7	71	44	241	36	175	10.17	18.41	20.55	11.68	21.15	23.61	18.82 ± 6.296
Kontrola		197	222	181	208	186	218	88.65	87.28	85.16	101.9	100.3	97.9	100.0 ± 2.017
Kvercetin	30	14	110	60	292	19	103	13.04	20.58	18.60	14.99	23.64	21.38	20.00 ± 4.488
Kontrola		197	222	181	208	186	218	88.65	87.28	85.16	101.9	100.3	97.85	100.0 ± 2.017
Kvercetin	25	25	227	22	130	23	107	11.11	16.67	21.35	12.77	19.15	24.53	18.82 ± 5.888
Kontrola		275	314	185	217	265	300	87.40	85.08	88.40	100.5	97.8	101.7	100.0 ± 1.957
Kvercetin	5	12	102	11	83	14	94	11.76	13.04	15.38	13.75	15.24	17.98	15.66 ± 2.145
Kontrola		164	193	164	192	152	178	85.31	85.63	85.81	104.3	104.7	105.0	104.7 ± 0.313
Kvercetin	2.5	22	133	25	108	43	109	16.22	23.33	39.56	18.63	26.81	45.45	30.30 ± 13.75
Kontrola		275	314	185	217	265	300	87.40	85.08	88.40	100.5	97.84	101.7	100.0 ± 1.957
Miricetin	50	60	126	125	186	36	110	47.62	67.10	32.61	54.71	77.09	37.47	56.43 ± 19.87
Kontrola		275	314	185	217	265	300	87.40	85.08	88.40	100.5	97.84	101.7	100.0 ± 1.957
Miricetin	15	92	108	95	115	75	93	85.19	82.61	80.65	100.5	97.49	95.17	97.73 ± 2.687
Kontrola		1	61	116	132	102	125	16.02	87.88	81.60	19.31	103.7	96.30	100.0 ± 56.74
Miricetin	10	28	104	78	103	100	122	26.92	75.73	81.97	35.26	99.18	107.4	103.3 ± 5.778
Kontrola				90	119	107	127		75.63	84.25		99.06	110.3	104.7 ± 7.985
Miricetin	5	150	205	141	189	110	146	73.17	74.60	75.34	95.56	97.43	98.40	97.13 ± 1.442
Kontrola		71	119	134	176	154	200	60.13	76.14	77.00	78.53	99.44	100.6	100.0 ± 12.41
Rutin	100	111	224	191	248	140	188	49.55	77.02	74.47	61.30	95.28	92.13	93.70 ± 2.229
Kontrola		175	215	185	229	204	254	81.40	80.79	80.31	100.7	99.94	99.36	100.0 ± 0.670
Rutin	50	135	174	133	173	121	159	77.59	76.88	76.10	101.6	100.7	99.67	100.7 ± 0.973
Kontrola		128	164	122	166	141	182	78.05	73.49	77.47	102.2	96.26	101.5	100.0 ± 3.248

Tabela 9.49. Rezultati ispitivanja citotoksičnog delovanja fenolnih kiselina, dihidrohalkona, stilbena, iridoida i triterpenske kiseline

	Radna c	Broj ćelija $\times 10^4$ ćelija/mL								Procenat vijabilnih ćelija u radnim probama				Procenat (%) vijabilnih ćelija (proba/kontrola)				Srednja vrednost
		Proba 1		Proba 2		Proba 3		Proba 4		1	2	3	4	1	2	3	4	
	$\mu\text{mol/L}$	vijabilne	ukupne	vijabilne	ukupne	vijabilne	ukupne	vijabilne	ukupne									
Galna k.	100	188	216	240	266	217	241			87.22	90.09	90.05		100.2	103.5	103.5	102.4 \pm 1.889	
Kontrola		197	222	181	208	186	218			88.65	87.28	85.16		101.9	100.3	97.85	100.0 \pm 2.017	
Hlorogenska k.	25	110	115	102	113	101	116			95.65	90.27	87.07		122.1	115.2	111.1	116.1 \pm 5.536	
Kontrola		102	140	72	92	68	81			72.86	78.26	83.95		92.98	99.88	107.1	100.0 \pm 7.080	
Kafena k.	100	106	135	129	131	112	128			78.52	98.47	87.50		83.62	104.9	93.18	99.03 \pm 8.263	
Kontrola		157	165	138	149	125	133			95.15	92.62	93.98		101.3	98.63	100.1	100.0 \pm 1.351	
Kumarinska k.	100	91	186	174	237	207	255			48.92	73.42	81.18		60.53	90.83	100.4	95.63 \pm 6.787	
Kontrola		175	215	185	229	204	254			81.40	80.79	80.31		100.7	99.94	99.36	100.0 \pm 0.670	
Protokatehinska	100	165	211	188	254	205	258			78.20	74.02	79.46		96.74	91.57	98.30	95.54 \pm 3.524	
Kontrola		175	215	185	229	204	254			81.40	80.79	80.31		100.7	99.94	99.36	100.0 \pm 0.670	
Siringinska k.	100	178	229	263	321	200	250			77.73	81.93	80.00		96.16	101.4	98.97	98.83 \pm 2.602	
Kontrola		175	215	185	229	204	254			81.40	80.79	80.31		100.7	99.94	99.36	100.0 \pm 0.670	
Vanilinska k.	100	181	223	178	219	171	221			81.17	81.28	77.38		100.4	100.5	95.72	98.90 \pm 2.748	
Kontrola		175	215	185	229	204	254			81.40	80.79	80.31		100.7	99.94	99.36	100.0 \pm 0.670	
Floretin	25	79	96	82	91	70	106			82.29	90.11	66.04		83.89	91.86	67.32	81.02 \pm 12.52	
Floretin	10	92	102	103	114	90	100			90.20	90.35	90.00		91.95	92.11	91.75	91.94 \pm 0.179	
Floretin	1	107	113	113	119	99	116	100	103	94.69	94.96	85.34	97.09	96.53	96.80	87.00	98.97	97.44 \pm 1.339
Kontrola		87	91	90	91	102	103	85	86	95.60	98.90	99.03	98.84	97.46	100.8	100.9	100.8	100.0 \pm 1.693
Pterostilben	25	113	125	85	101	87	92	72	83	90.40	84.16	94.57	86.75	92.16	85.79	96.40	88.43	90.70 \pm 4.614
Pterostilben	10	123	129	66	87	77	78	63	65	95.35	75.86	98.72	96.92	97.20	77.34	100.6	98.81	98.88 \pm 10.86
Pterostilben	1	92	95	122	125	97	100	71	73	96.84	97.60	97.00	97.26	98.72	99.50	98.89	99.15	99.06 \pm 0.338
Kontrola		87	91	90	91	102	103	85	86	95.60	98.90	99.03	98.84	97.46	100.8	100.9	100.8	100.0 \pm 1.693
Rezveratrol	50	120	178	115.2	156	84	100.8			67.57	73.85	83.33		77.64	84.85	95.75	86.08 \pm 9.120	
Kontrola		197	222	181.2	207.6	186	218.4			88.65	87.28	85.16		101.9	100.3	97.85	100.0 \pm 2.017	
Rezveratrol	25	122	132	111.6	129.6	117.6	130.8			92.73	86.11	89.91		106.5	98.94	103.3	102.9 \pm 3.815	
Kontrola		154	180	147.6	170.4	142.8	166.8			85.33	86.62	85.61		99.39	100.9	99.72	100.0 \pm 0.788	
Aukubin	25	2	50	2	50	19	60			4.000	4.000	31.67		5.10	5.10	40.41	16.87 \pm 20.39	
Kontrola		102	140	72	92	68	81			72.86	78.26	83.95		93.0	99.9	107.1	100.0 \pm 7.080	
Aukubin	5	75	90	67	77	114	134			83.33	87.01	85.07		100.6	105.0	102.7	102.8 \pm 2.221	
Kontrola		61	72	80	125	95	115			84.72	64.00	82.61		101.4	76.60	98.87	92.29 \pm 13.65	
Ursolna k.	50	0	1	0	1	0	1			0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	
Kontrola		102	140	72	92	68	81			72.86	78.26	83.95		92.98	99.88	107.1	100.0 \pm 7.080	
Ursolna k.	5	49	148	40.5	103	82	92			33.11	39.32	89.13		37.67	44.74	101.4	41.21 \pm 4.991	
Ursolna k.	2.5	89	105	216	245	106	116			84.76	88.16	91.38		96.45	100.3	104.0	100.3 \pm 3.765	
Kontrola		117	132	94	108	117	133			88.64	87.04	87.97		100.9	99.04	100.1	100.0 \pm 0.941	

Tabela 9.50. Rezultati ispitivanja citotoksičnog delovanja standardnih inhibitora ciklooksigenaza

radna c	μmol/	Broj ćelija × 10 ⁴ ćelija/mL								Procenat vijabilnih ćelija u radnim probama				Procenat (%) vijabilnih ćelija (proba/kontrola)				
		Proba 1		Proba 2		Proba 3		Proba 4		1	2	3	4	1	2	3	4	
		vijabiln	ukupne	vijabiln	ukupne	vijabiln	ukupne	vijabiln	ukupne									
Aspirin	100	54	175	190	246	213	273			30.86	77.24	78.02		38.17	95.55	96.52	96.04 ± 0.688	
Kontrola		175	215	185	229	204	254			81.40	80.79	80.31		100.7	99.94	99.36	100.0 ± 0.670	
Aspirin	50	91.25	128.5	80	115	90	118			71.01	69.57	76.27		95.84	93.89	102.9	97.56 ± 6.400	
Kontrola		91	119	71	99	83	133			76.47	71.72	62.41		103.2	96.79	84.23	100.0 ± 9.656	
Aspirin	25	112.5	125	114	131	105	149			90.00	87.02	70.47		121.4	117.4	95.11	111.3 ± 14.20	
Kontrola		91	119	71	99	83	133			76.47	71.72	62.41		103.2	96.79	84.23	100.0 ± 9.656	
Celekoksib	50	0	1	0	10	0	10			0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.000	
Kontrola		120	163	80	166	136	182			73.62	48.19	74.73		99.25	64.97	100.7	100.0 ± 1.054	
Celekoksib	25	0	10	0	10	0	10			0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.000	
Kontrola		120	163	80	166	136	182			73.62	48.19	74.73		99.25	64.97	100.7	100.0 ± 1.054	
Celekoksib	10	143	179	126	154	76	114	65	108	79.89	81.82	66.67	60.19	96.42	98.75	80.46	72.6	91.87 ± 12.93
Kontrola		123	141	142	166	157	180			87.23	85.54	87.22		100.7	98.70	100.6	100.0 ± 1.123	
Celekoksib	5	104	138	114	154	131	173			75.36	74.03	75.72		98.71	96.95	99.18	98.28 ± 1.171	
Kontrola		120	163	80	166	136	182			73.62	48.19	74.73		99.25	64.97	100.7	100.0 ± 1.054	
Indometacin	50	27	129	64	141	45	125			20.93	45.39	36.00		27.41	59.45	47.15	44.67 ± 16.16	
Kontrola		120	163	80	166	136	182			73.62	48.19	74.73		99.25	64.97	100.7	100.0 ± 1.054	
Indometacin	25	113	177	70	138	87	145			63.84	50.72	60.00		83.62	66.44	78.58	76.21 ± 8.832	
Kontrola		120	163	80	166	136	182			73.62	48.19	74.73		99.25	64.97	100.7	100.0 ± 1.054	
Indometacin	15	122	145	119	138	102	128	128	155	84.14	86.23	79.69	82.58	100.7	103.2	95.39	98.9	99.77 ± 5.539
Kontrola		140	163	124	159	144	166			85.89	77.99	86.75		102.8	93.35	103.8	100.0 ± 5.780	
Indometacin	10	123	147	98	110	121	154			83.67	89.09	78.57		100.2	106.6	94.1	100.3 ± 6.297	
Kontrola		140	163	124	159	144	166			85.89	77.99	86.75		102.8	93.35	103.8	100.0 ± 5.780	
indometacin	5	105	152	115	157	110	150			69.08	73.25	73.33		90.48	95.94	96.05	95.99 ± 0.079	
Kontrola		120	163	80	166	136	182			73.62	48.19	74.73		99.25	64.97	100.7	100.0 ± 1.054	
SC-560	300	13	70	12	68	66	90	40	90	18.57	17.65	73.33		18.93	17.99	74.76	37.23 ± 32.51	
Kontrola		87	91	90	91	102	103	85	86	95.60	98.90	99.03	98.84	97.46	100.8	101.0	100.8	100.0 ± 1.693
SC-560	30	115	117	97	99	94	95	105	106	98.29	97.98	98.95	99.06	100.2	99.88	100.9	101.0	100.5 ± 0.528
Kontrola		87	91	90	91	102	103	85	86	95.60	98.90	99.03	98.84	97.46	100.8	101.0	100.8	100.0 ± 1.693

Tabela.9.51. Rezultati ispitivanja citotoksičnog delovanja sintetskih jedinjenja

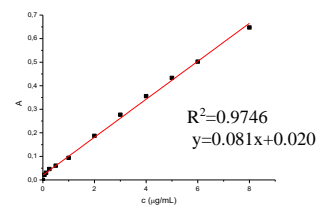
	radna c μmol/L	Broj ćelija × 10 ⁴ ćelija/mL						procenat vijabilnih ćelija u probama			Procenat (%) vijabilnih ćelija (proba/kontrola)			
		proba 1		proba 2		proba 3		1	2	3	1	2	3	Srednja vrednost
<i>trans-1</i>	100.0	110	140	125	173	134	173	78.82	72.34	77.55	92.85	85.21	91.35	89.80 ± 4.045
	50.00	143	169	154	180	125	179	84.40	85.33	69.80	99.42	100.5	82.22	99.97 ± 0.780
	25.00	84	104	98	121	126	155	80.46	80.86	81.40	94.78	95.25	95.88	95.30 ± 0.553
	12.50	173	188	184	208	151	169	91.72	88.44	89.36	110.5	106.5	107.6	108.2 ± 2.037
	6.250	176	200	157	176	196	251	88.02	89.12	77.99	106.0	107.3	93.92	102.4 ± 7.385
Kontrola		157	184	185	220	143	180	85.62	84.15	79.33	100.9	99.13	93.45	100.0 ± 1.223
<i>trans-2</i>	100.0	247	274	164	187	169	198	90.35	87.82	85.45	108.0	104.9	102.1	105.0 ± 2.926
Kontrola		154	184	197	221	164	210	83.66	89.13	78.29	100.0	106.5	93.54	100.0 ± 6.479
3	100.0	89	218	78	155	98	262	40.66	50.39	37.61	47.90	59.36	42.47	46.10 ± 2.536
	50.00	124	162	104	150	152	210	76.30	69.60	72.57	89.88	81.99	85.49	85.78 ± 3.952
	25.00	193	223	180	209	186	215	86.56	86.21	86.59	102.0	101.6	102.0	101.8 ± 0.028
	12.50	155	181	158	184			85.43	86.27		100.6	101.6		101.1 ± 0.703
	6.250	181	203	172	186			89.35	92.26		105.3	108.7		107.0 ± 2.423
Kontrola		157	184	185	220	143	180	85.62	84.15	79.33	100.9	99.13	93.45	100.0 ± 1.223
<i>trans-4</i>	100.0	144	180	130	196	202	252	80.00	66.26	80.00	97.95	81.13	97.95	97.95 ± 0.000
	50.00	149	180	156	192			82.67	81.25		101.2	99.48		100.4 ± 1.227
Kontrola		128	158	194	226	154	197	81.06	85.90	78.05	99.25	105.2	95.56	100.0 ± 4.853

9.3. Metanolni i vodeni ekstrakti bokvica kao modulatori produkcije PGE₂ i TXA₂

9.3.1. Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i tanina u ekstraktima bokvica

Tabela 9.52. Kalibraciona kriva galne kiseline korišćena za određivanje sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima bokvica

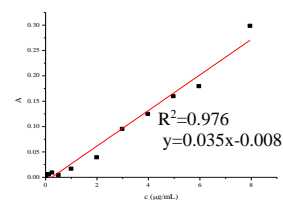
početna c µg/mL	radna c µg/mL	A1	A2	A3	A korekcija	A
80.00	8.000	0.747	0.727	0.727	0.067	0.647
60.00	6.000	0.590	0.582	0.589	0.065	0.502
50.00	5.000	0.521	0.511	0.514	0.062	0.433
40.00	4.000	0.442	0.436	0.430	0.060	0.356
30.00	3.000	0.361	0.356	0.344	0.057	0.277
20.00	2.000	0.267	0.267	0.255	0.056	0.187
10.00	1.000	0.169	0.164	0.166	0.053	0.094
5.000	0.500	0.128	0.132	0.128	0.049	0.060
2.500	0.250	0.122	0.123	0.122	0.056	0.046
1.250	0.125	0.111	0.113	0.089	0.054	0.031
0.630	0.063	0.102	0.099	0.083	0.053	0.022
0.000	0.000	0.078	0.073	0.067	0.052	0.000



Grafik 9.1. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima bokvica: funkcija zavisnosti apsorbcije od koncentracije galne kiseline

Tabela 9.53. Kalibraciona kriva kvercetina korišćena za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida u ekstraktima bokvica

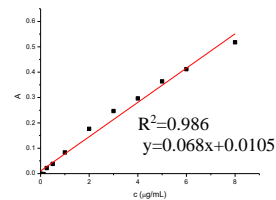
početna c µg/mL	radna c µg/mL	A1	A2	A3	A korekcija	A
80.00	7.947	0.499	0.535	0.500	0.196	0.299
60.00	5.960	0.326	0.326	0.334	0.145	0.180
50.00	4.967	0.293	0.309	0.289	0.136	0.160
40.00	3.974	0.252	0.262	0.262	0.129	0.125
30.00	2.980	0.205	0.211	0.205	0.107	0.096
20.00	1.987	0.161	0.167	0.164	0.121	0.039
10.00	0.993	0.104	0.110	0.103	0.084	0.017
5.000	0.497	0.082	0.084	0.081	0.073	0.005
2.500	0.248	0.074	0.070	0.071	0.056	0.009
1.250	0.124	0.065	0.065	0.064	0.054	0.005
0.630	0.062	0.067	0.061	0.072	0.053	0.006
0.000	0.000	0.061	0.060	0.060	0.055	0.000



Grafik 9.2. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida u ekstraktima bokvica: funkcija zavisnosti apsorbcije od koncentracije kvercetina

Tabela 9.54. Kalibraciona kriva katehina za određivanje sadržaja ukupnih tanina u ekstraktima bokvica

početna c μg/mL	radna c μg/mL	A1	A2	A3	A korekcija	A
80.00	8.000	0.599	0.599	0.570	0.052	0.518
60.00	6.000	0.503	0.496	0.493	0.053	0.412
50.00	5.000	0.446	0.437	0.453	0.052	0.364
40.00	4.000	0.363	0.392	0.396	0.051	0.296
30.00	3.000	0.327	0.327	0.326	0.050	0.247
20.00	2.000	0.258	0.260	0.263	0.053	0.177
10.00	1.000	0.162	0.167	0.185	0.051	0.083
5.000	0.500	0.119	0.120	0.131	0.052	0.038
2.500	0.250	0.102	0.101	0.095	0.050	0.022
1.250	0.125	0.083	0.078	0.077	0.052	-0.002
0.625	0.063	0.072	0.076	0.077	0.052	-0.005
0.000	0.000	0.083	0.081	0.086	0.052	0.000



Grafik 9.3. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja ukupnih tanina u ekstraktima bokvica: funkcija zavisnosti apsorbancije od koncentracije katehina

Tabela 9.55. Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima bokvica

	A1	A2	A3	A korekcija	A	očitanje c galne kiseline(µg/mL)	µg ekvivalenata galne kiseline	mg suvog ekstrakta	µg ekvivalenata galne kiseline/ mg suvog ekstrakta	
PALM	0.482	0.464	0.510	0.056	0.386	4.537	1.361	0.019	72.59	71.88
	0.307	0.302	0.306	0.055	0.207	2.314	0.694	0.009	74.04	±
	0.204	0.201	0.210	0.054	0.107	1.078	0.324	0.005	69.02	2.581
slepa proba	0.098	0.094	0.100	0.054						
PALV	0.370	0.376	0.395	0.053	0.284	3.270	0.981	0.019	52.32	50.36
	0.245	0.251	0.240	0.054	0.155	1.667	0.500	0.009	53.33	±
	0.167	0.170	0.167	0.054	0.077	0.710	0.213	0.005	45.42	4.307
slepa proba	0.090	0.090	0.090	0.054						
PARM	0.500	0.497	0.512	0.062	0.402	4.741	1.422	0.019	75.85	76.37
	0.314	0.325	0.313	0.053	0.226	2.553	0.766	0.009	81.71	±
	0.200	0.197	0.203	0.051	0.110	1.118	0.335	0.005	71.56	5.098
slepa proba	0.087	0.094	0.092	0.053						
PARV	0.576	0.581	0.562	0.053	0.472	5.599	1.680	0.026	65.32	63.96
	0.347	0.363	0.346	0.054	0.244	2.781	0.834	0.013	64.89	±
	0.228	0.231	0.232	0.056	0.127	1.322	0.397	0.006	61.68	1.990
slepa proba	0.099	0.103	0.103	0.054						
PHOM	0.627	0.627	0.605	0.053	0.485	5.761	1.728	0.009	184.4	189.6
	0.410	0.417	0.414	0.054	0.271	3.110	0.933	0.005	199.0	±
	0.279	0.279	0.283	0.055	0.137	1.448	0.434	0.002	185.3	8.209
slepa proba	0.140	0.150	0.146	0.054						
PHOV	0.578	0.557	0.582	0.052	0.462	5.475	1.642	0.015	109.5	116.7
	0.380	0.371	0.375	0.054	0.262	3.004	0.901	0.008	120.2	±
	0.267	0.256	0.241	0.055	0.142	1.507	0.452	0.004	120.6	6.275
slepa proba	0.133	0.117	0.105	0.052						
PLAM	0.356	0.351	0.346	0.051	0.291	3.365	1.009	0.019	53.84	53.93
	0.212	0.218	0.220	0.052	0.156	1.688	0.506	0.009	54.03	±
	0.135	0.132	0.133	0.065	0.058	0.467	0.140	0.005	29.88	0.134
slepa proba	0.058	0.057	0.063	0.048						
PLAV	0.390	0.380	0.390	0.063	0.310	3.589	1.077	0.030	35.89	35.04
	0.234	0.234	0.235	0.053	0.167	1.824	0.547	0.015	36.47	±
	0.150	0.148	0.155	0.050	0.086	0.819	0.246	0.008	32.75	2.002
slepa proba	0.062	0.063	0.064	0.048						
PMAM	0.504	0.523	0.531	0.052	0.457	5.421	1.626	0.030	54.21	53.17
	0.301	0.304	0.300	0.051	0.240	2.731	0.819	0.015	54.62	±
	0.180	0.183	0.183	0.050	0.122	1.267	0.380	0.008	50.68	2.166
slepa proba	0.059	0.062	0.060	0.051						
PMAV	0.407	0.407	0.385	0.053	0.336	3.922	1.176	0.030	39.22	38.40
	0.246	0.250	0.245	0.053	0.176	1.937	0.581	0.015	38.74	±
	0.164	0.163	0.163	0.051	0.095	0.931	0.279	0.008	37.24	1.030
slepa proba	0.066	0.067	0.067	0.049						
PMEM	0.445	0.433	0.439	0.053	0.371	4.357	1.307	0.009	139.4	136.9
	0.260	0.265	0.264	0.053	0.195	2.167	0.650	0.005	138.7	±
	0.171	0.173	0.169	0.052	0.104	1.036	0.311	0.002	132.6	3.778
slepa proba	0.065	0.063	0.063	0.049						
PMEV	0.306	0.305	0.299	0.052	0.243	2.766	0.830	0.009	88.52	86.44
	0.197	0.191	0.194	0.052	0.134	1.412	0.424	0.005	90.40	±
	0.133	0.129	0.129	0.052	0.071	0.628	0.188	0.002	80.39	5.321
slepa proba	0.059	0.060	0.060	0.052	0.386	4.537	1.361	0.019		

Tabela 9.56. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima bokvica

	A1	A2	A3	A korekcija	A	očitanje kvercetina ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	μg ekvivalena kvercetina	mg suvog ekstrakta	μg ekvivalenata kvercetina/ mg suvog ekstrakta	
PALM	0.477	0.506	0.482	0.208	0.280	8.222	2.483	0.214	11.59	11.95
	0.245	0.356	0.375	0.150	0.209	6.213	1.876	0.150	12.51	±
	0.249	0.274	0.283	0.134	0.138	4.172	1.260	0.107	11.76	0.490
slepa proba	0.065	0.058	0.060	0.055						
PALV	0.263	0.327	0.329	0.157	0.167	5.004	1.511	0.150	10.07	11.09
	0.273	0.311	0.316	0.151	0.145	4.391	1.326	0.113	11.79	±
	0.204	0.204	0.204	0.109	0.091	2.835	0.856	0.075	11.42	0.901
slepa proba	0.072	0.061	0.057	0.055						
PARM	0.264	0.380	0.388	0.116	0.261	7.702	2.326	0.072	32.30	30.43
	0.324	0.402	0.417	0.120	0.283	8.326	2.515	0.081	31.04	±
	0.224	0.221	0.226	0.086	0.132	3.998	1.207	0.043	27.95	2.241
slepa proba	0.056	0.056	0.055	0.050						
PARV	0.318	0.357	0.355	0.177	0.171	5.129	1.549	0.150	10.33	10.81
	0.213	0.322	0.324	0.175	0.140	4.240	1.281	0.113	11.38	±
	0.184	0.205	0.211	0.115	0.085	2.661	0.804	0.075	10.72	0.534
slepa proba	0.056	0.056	0.056	0.049						
PHOM	0.238	0.266	0.264	0.126	0.135	4.096	1.237	0.030	41.23	39.88
	0.173	0.182	0.186	0.103	0.077	2.430	0.734	0.019	39.14	±
	0.152	0.158	0.158	0.092	0.060	1.950	0.589	0.015	39.27	1.174
slepa proba	0.057	0.065	0.057	0.053						
PHOV	0.273	0.352	0.354	0.151	0.198	5.890	1.779	0.075	23.72	23.48
	0.253	0.293	0.293	0.136	0.152	4.586	1.385	0.060	23.08	±
	0.164	0.205	0.207	0.107	0.094	2.936	0.887	0.038	23.65	0.349
slepa proba	0.060	0.059	0.059	0.055						
PLAM	0.434	0.448	0.481	0.226	0.219	6.495	1.961	0.300	6.538	6.334
	0.283	0.361	0.381	0.221	0.141	4.265	1.288	0.214	6.011	±
	0.250	0.259	0.274	0.149	0.104	3.205	0.968	0.150	6.454	0.283
slepa proba	0.066	0.055	0.055	0.050						
PLAV	0.252	0.268	0.262	0.158	0.098	3.034	0.916	0.150	6.108	5.581
	0.161	0.162	0.168	0.121	0.038	1.329	0.401	0.075	5.351	±
	0.158	0.154	0.155	0.125	0.026	0.984	0.297	0.056	5.285	0.457
slepa proba	0.059	0.059	0.082	0.055						
PMAM	0.325	0.417	0.395	0.146	0.255	7.527	2.273	0.214	10.61	10.31
	0.205	0.237	0.236	0.109	0.123	3.742	1.130	0.107	10.55	±
	0.165	0.174	0.171	0.091	0.077	2.431	0.734	0.075	9.79	0.457
slepa proba	0.056	0.056	0.054	0.051						
PMAV	0.361	0.355	0.352	0.159	0.191	5.703	1.722	0.300	5.741	5.857
	0.211	0.219	0.211	0.121	0.088	2.741	0.828	0.150	5.518	±
	0.182	0.187	0.187	0.106	0.074	2.351	0.710	0.113	6.312	0.409
slepa proba	0.062	0.059	0.056	0.054						
PMEM	0.385	0.476	0.485	0.167	0.307	9.006	2.720	0.113	24.18	24.24
	0.302	0.345	0.344	0.140	0.199	5.905	1.783	0.075	23.78	±
	0.257	0.273	0.287	0.121	0.153	4.611	1.392	0.056	24.76	0.492
slepa proba	0.058	0.055	0.059	0.051						
PMEV	0.426	0.427	0.441	0.194	0.230	6.793	2.051	0.150	13.68	14.36
	0.338	0.346	0.359	0.151	0.183	5.469	1.652	0.113	14.68	±
	0.238	0.255	0.259	0.129	0.120	3.660	1.105	0.075	14.74	0.597
slepa proba	0.060	0.055	0.057	0.050						

Tabela 9.57. Sadržaj ukupnih tanina u ekstraktima PALM, PALV, PARM, PARV, PHOM i PHOV

	A1	A2	A3	A korekcija	A	očitanje c katehina (µg/mL)	µg ekvivalenata katehina	mg suvog ekstrakta	µg ekvivalenata katehina/ mg suvog ekstrakta	Sadržaj tanina	
										µg ekvivalenata katehina/ mg suvog ekstrakta	µg ekvivalenata katehina/ mg suvog ekstrakta
PALM	0.482	0.464	0.510	0.056	0.386	5.554	1.666	0.019	88.87	63.46	66.55
	0.307	0.302	0.306	0.055	0.207	2.903	0.871	0.009	92.89	66.28	±
	0.204	0.201	0.210	0.054	0.107	1.429	0.429	0.005	91.48	69.90	3.228
slepa proba	0.098	0.094	0.100	0.054							
PALM istaloženi tanini	0.212	0.207	0.209	0.058	0.118	1.588	0.476	0.019	25.40		
	0.157	0.155	0.156	0.056	0.067	0.831	0.249	0.009	26.61		
	0.122	0.121	0.124	0.055	0.033	0.337	0.101	0.005	21.58		
slepa proba	0.084	0.085	0.083	0.050							
PALV	0.370	0.376	0.395	0.053	0.284	4.043	1.213	0.019	64.70	45.17	48.74
	0.245	0.251	0.240	0.054	0.155	2.131	0.639	0.009	68.19	50.55	±
	0.167	0.170	0.167	0.054	0.077	0.989	0.297	0.005	63.32	50.48	3.088
slepa proba	0.090	0.090	0.090	0.054							
PALV istaloženi tanini	0.177	0.179	0.175	0.052	0.093	1.220	0.366	0.019	19.53		
	0.136	0.135	0.134	0.055	0.048	0.551	0.165	0.009	17.63		
	0.111	0.112	0.110	0.055	0.024	0.201	0.060	0.005	12.84		
slepa proba	0.082	0.083	0.080	0.050							
PARM	0.500	0.497	0.512	0.062	0.402	5.798	1.739	0.019	92.76	64.89	66.33
	0.314	0.325	0.313	0.053	0.226	3.189	0.957	0.009	102.0	80.72	±
	0.200	0.197	0.203	0.051	0.110	1.477	0.443	0.005	94.50	67.77	2.035
slepa proba	0.087	0.094	0.092	0.053							
PARM istaloženi tanini	0.213	0.212	0.206	0.053	0.128	1.742	0.523	0.019	27.87		
	0.156	0.156	0.155	0.070	0.056	0.666	0.200	0.009	21.32		
	0.121	0.122	0.122	0.053	0.039	0.418	0.125	0.005	26.73		
slepa proba	0.077	0.082	0.076	0.048							
PARV	0.576	0.581	0.562	0.053	0.472	6.821	2.046	0.030	68.21	46.04	42.15
	0.347	0.363	0.346	0.054	0.244	3.460	1.038	0.015	69.20	38.15	±
	0.228	0.231	0.232	0.056	0.127	1.720	0.516	0.008	68.78	42.26	3.946
slepa proba	0.099	0.103	0.103	0.054							
PARV istaloženi tanini	0.232	0.228	0.223	0.055	0.160	2.217	0.665	0.030	22.17		
	0.190	0.185	0.181	0.055	0.115	1.553	0.466	0.015	31.05		
	0.123	0.121	0.118	0.054	0.055	0.663	0.199	0.008	26.52		
slepa proba	0.062	0.065	0.061	0.050							
PHOM	0.627	0.627	0.605	0.053	0.485	7.014	2.104	0.009	224.5	156.9	163.5
	0.410	0.417	0.414	0.054	0.271	3.852	1.156	0.005	246.5	165.1	±
	0.279	0.279	0.283	0.055	0.137	1.870	0.561	0.002	239.3	165.6	4.897
slepa proba	0.140	0.150	0.146	0.054							
PHOM istaloženi tanini	0.211	0.215	0.216	0.052	0.153	2.112	0.633	0.009	67.57		
	0.156	0.162	0.162	0.055	0.096	1.272	0.382	0.005	81.42		
	0.113	0.110	0.107	0.053	0.049	0.576	0.173	0.002	73.75		
slepa proba	0.062	0.057	0.057	0.050							
PHOV	0.578	0.557	0.582	0.052	0.469	6.787	2.036	0.015	135.7	88.60	95.55
	0.380	0.371	0.375	0.054	0.262	3.726	1.118	0.008	149.0	97.13	±
	0.267	0.256	0.241	0.055	0.135	1.848	0.554	0.004	147.8	100.9	6.310
slepa proba	0.133	0.117	0.105	0.052							
PHOV istaloženi tanini	0.250	0.230	0.229	0.052	0.170	2.357	0.707	0.015	47.13		
	0.190	0.164	0.159	0.056	0.098	1.298	0.389	0.008	51.90		
	0.121	0.114	0.111	0.054	0.050	0.586	0.176	0.004	46.88		
slepa proba	0.058	0.059	0.055	0.050							

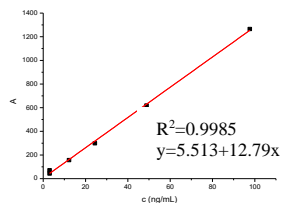
Tabela 9.58. Sadržaj ukupnih tanina u ekstraktima PLAM, PARV, PMAM, PMAV, PMEM, PMEUV

	A1	A2	A3	A korekcija	A	očitanje c katehina (µg/mL)	µg ekvivalenata katehina	mg suvog ekstrakta	µg ekvivalenata katehina/ mg suvog ekstrakta	Sadržaj tanina µg ekvivalenata katehina/ mg suvog ekstrakta	
PLAM	0.356	0.351	0.346	0.051	0.291	4.156	1.247	0.019	66.50	44.97	47.54
	0.212	0.218	0.220	0.052	0.156	2.157	0.647	0.009	69.02	50.11	±
	0.135	0.132	0.133	0.065	0.058	0.700	0.210	0.005	44.79	29.81	3.634
slepa proba	0.058	0.057	0.063	0.048							
PLAM istaloženi tanini	0.160	0.158	0.161	0.051	0.101	1.346	0.404	0.019	21.53		
	0.112	0.110	0.107	0.052	0.050	0.591	0.177	0.009	18.91		
	0.088	0.086	0.085	0.053	0.026	0.234	0.070	0.005	14.98		
slepa proba	0.053	0.054	0.052	0.046							
PLAV	0.390	0.380	0.390	0.063	0.310	4.424	1.327	0.030	44.24	27.05	28.37
	0.234	0.234	0.235	0.053	0.167	2.318	0.695	0.015	46.36	28.22	±
	0.150	0.148	0.155	0.050	0.086	1.120	0.336	0.008	44.79	29.84	1.402
slepa proba	0.062	0.063	0.064	0.048							
PLAV istaloženi tanini	0.183	0.180	0.182	0.051	0.127	1.719	0.516	0.030	17.19		
	0.131	0.131	0.127	0.055	0.072	0.907	0.272	0.015	18.14		
	0.090	0.090	0.090	0.051	0.036	0.374	0.112	0.008	14.95		
slepa proba	0.050	0.053	0.052	0.048							
PMAM	0.504	0.523	0.531	0.052	0.457	6.608	1.983	0.030	66.08	47.30	48.85
	0.301	0.304	0.300	0.051	0.240	3.401	1.020	0.015	68.01	49.75	±
	0.180	0.183	0.183	0.050	0.122	1.654	0.496	0.008	66.17	49.49	1.345
slepa proba	0.059	0.062	0.060	0.051							
PMAM istaloženi tanini	0.189	0.194	0.185	0.050	0.137	1.878	0.563	0.030	18.78		
	0.130	0.131	0.128	0.056	0.072	0.913	0.274	0.015	18.26		
	0.096	0.094	0.095	0.054	0.039	0.417	0.125	0.008	16.68		
slepa proba	0.053	0.051	0.053	0.051							
PMAV	0.407	0.407	0.385	0.053	0.336	4.820	1.446	0.030	48.20	32.38	32.42
	0.246	0.250	0.245	0.053	0.176	2.453	0.736	0.015	49.06	31.24	±
	0.164	0.163	0.163	0.051	0.095	1.254	0.376	0.008	50.14	33.64	1.199
slepa proba	0.066	0.067	0.067	0.049							
PMAV istaloženi tanini	0.183	0.180	0.180	0.056	0.117	1.583	0.475	0.030	15.83		
	0.135	0.135	0.136	0.058	0.071	0.891	0.267	0.015	17.83		
	0.101	0.103	0.100	0.056	0.038	0.413	0.124	0.008	16.50		
slepa proba	0.053	0.058	0.058	0.049							
PMEM	0.445	0.433	0.439	0.053	0.371	5.340	1.602	0.009	170.9	129.4	128.0
	0.260	0.265	0.264	0.053	0.195	2.728	0.818	0.005	174.6	126.2	±
	0.171	0.173	0.169	0.052	0.104	1.378	0.413	0.002	176.4	128.4	1.606
slepa proba	0.065	0.063	0.063	0.049							
PMEM istaloženi tanini	0.158	0.158	0.156	0.052	0.098	1.297	0.389	0.009	41.50		
	0.122	0.127	0.127	0.057	0.062	0.755	0.227	0.005	48.34		
	0.096	0.095	0.095	0.053	0.036	0.375	0.113	0.002	48.04		
slepa proba	0.055	0.058	0.055	0.049							
PMEV	0.306	0.305	0.299	0.052	0.243	3.443	1.033	0.009	110.2	81.07	80.14
	0.197	0.191	0.194	0.052	0.134	1.828	0.548	0.005	117.0	87.35	±
	0.133	0.129	0.129	0.052	0.071	0.892	0.268	0.002	114.2	72.01	7.709
slepa proba	0.059	0.060	0.060	0.052							
PMEV istaloženi tanini	0.129	0.134	0.127	0.054	0.072	0.909	0.273	0.009	29.10		
	0.109	0.107	0.104	0.061	0.042	0.463	0.139	0.005	29.63		
	0.098	0.098	0.098	0.061	0.033	0.330	0.099	0.002	42.18		
slepa proba	0.056	0.056	0.057	0.053							

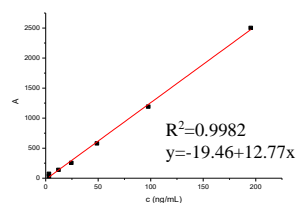
9.3.2. Sadržaj odabranih jedinjenja u bokvicama određen primenom HPLC-MS/MS tehnike

Tabela 9.59. Površine pikova standardnih jedinjenja detektovanih u ekstraktima bokvica primenom HPLC-MS/MS tehnike koje su korišćene za konstruisanje kalibracionih kriva

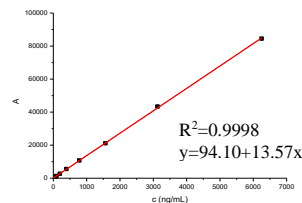
Koncentracija Jedinjenje	1.526	3.052	6.104	12.21	24.41	48.83	97.66	195.3	390.6	781.3	1563	3125	6250	12500	25000
	Površina pika														
2,5-Dihidroksibenzoeva		43	71	157	299	618	1265	2783	6432	12455	24810	47317	86938	155269	264337
Ferulna		32	74	139	256	579	1192	2502	5075	9598	19014	37947	69795	122021	194368
Hlorogenska		23	99	136	326	710	1409	2701	5543	10713	21136	43370	84499	162646	296160
Hlorogenska II			14	33	58	120	236	466	897	1920	3461	6716	12370	21694	34400
Kafena			123	264	642	1364	2733	5206	10697	21168	40514	78976	144948	257021	434426
<i>p</i> -OH-benzoeva		104	126	242	626	1177	2246	4332	8357	15257	27715	50750	86676	138171	192804
<i>p</i> -Kumarinska	101	163	260	545	1079	2218	4125	8102	15633	28562	53377	97699	173986	284737	447818
Protokatehinska	26	60	105	243	412	940	1964	3948	7442	14144	27181	52295	95075	161669	257997
Siringinska			11	36	72	128	336	614	1389	2808	5606	11914	23210	43619	77857
Vanilinska I						45	145	271	484	1057	2253	4470	8319	14919	24223
Vanilinska II					17	72	90	201	547	903	2387	5763	6207	10773	16664
Amentoflavon		41	91	153	229	231	656	1801	6920	19699	6654	15313	97525	171007	479139
Apigenin		63	141	355	805	1700	3452	7077	13283	24462	44799	82330	141157	237253	361340
Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid		24	87	159	246	585	1171	2385	4443	8420	15504	28424	45973	68088	79148
Apiin		6	42	99	132	192	445	786	1374	2766	5756	10493	19516	34939	55815
Krizeoeriol	35	100	216	466	997	2099	4097	8052	15407	27714	47590	75664	122234	173686	232955
Kvercetin-3- <i>O</i> -heksozid				80	124	340	697	1328	2744	5551	10112	19516	35190	61727	97884
Kvercetin-3- <i>O</i> -heksozid II	10	19	137	338	668	1337	3419	6712	12906	24745	49441	164015	176892	281670	469952
Kemferol-3- <i>O</i> -glukozid			19	34	106	160	296	632	1360	2595	5154	10566	17487	31104	47466
Luteolin-7- <i>O</i> -glukozid			76	124	329	563	1055	2168	3951	8156	15624	31372	59770	105074	175804
Luteolin			104	268	572	1360	2681	5254	10205	19436	37589	79909	159427	279928	508799
Rutin			40	57	118	291	554	1034	2041	4151	8179	15845	31484	59868	101257
Rutin II	2	7	13	13	30	65	167	283	563	1149	2173	4233	7996	14489	20952
Viteksin	11		36	100	175	383	800	1647	3140	5966	11910	23456	45042	85539	149803
Eskuletin		23	70	120	268	605	1050	2123	4146	7550	14162	27294	50935	87208	155308
Izokopoletin			61	92	136	256	547	1122	2216	4278	8575	16653	30289	57441	96416
Skopoletin			110	269	522	962	1924	3685	7277	13438	24313	44114	73606	109800	151588
Umbeliferon			5	19	8	20	58	164	178	339	662	1101	2036	3143	4706
Hinska kiselina			29	70	179	344	711	1420	2815	5493	10972	21155	36782	59764	
Ursolna kiselina					107	301	503	913	1208	1997	2753	3750	4561	5922	
Ursolna kiselina II	29	30	28	43	31	45	111	66	534	1821	5300	18343	24492	34537	



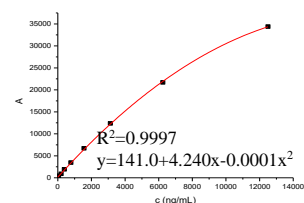
Grafik 9.4. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja 2,5-dihidroksibenzojeve kiseline u ekstraktima bokvica: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije 2,5 - dihidroksibenzojeve kiseline



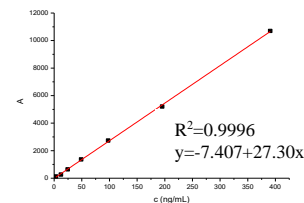
Grafik 9.5. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja ferulne kiseline u ekstraktima bokvica: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije ferulne kiseline



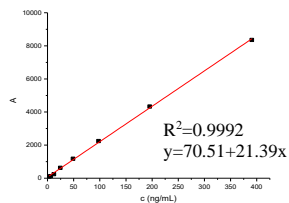
Grafik 9.6. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja hlorogenske kiseline u PALM, PALV, PARM, PARV, PHOM, PHOV, PLAM, PLAV: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije hlorogenske kiseline



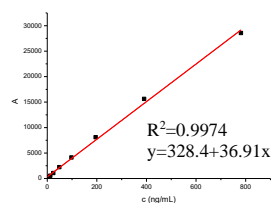
Grafik 9.7. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja hlorogenske kiseline u PMAM, PMAV, PMEM i PMEVI: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije hlorogenske kiseline



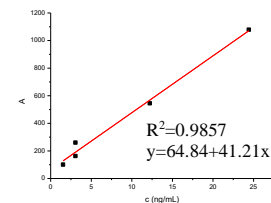
Grafik 9.8. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja kafene kiseline u ekstraktima bokvica: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije kafene kiseline



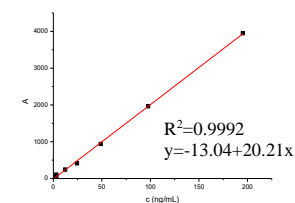
Grafik 9.9. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja p-OH benzojeve kiseline u ekstraktima bokvica: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije p-OH benzojeve kiseline



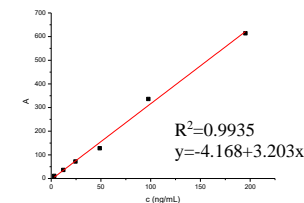
Grafik 9.10. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja p-kumarinske kiseline u PALM, PALV, PARM, PARV, PHOM, PHOV, PLAM, PLAV: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije p-kumarinske kiseline



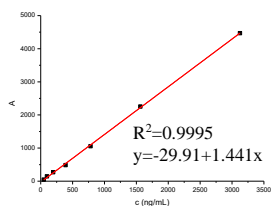
Grafik 9.11. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja p-kumarinske kiseline u PMAM, PMAV, PMEM, PMEVI: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije p-kumarinske kiseline



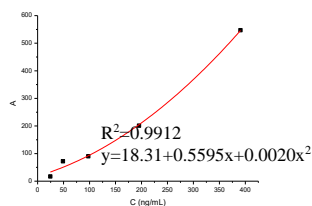
Grafik 9.12. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja protokatehinske kiseline u ekstraktima bokvica: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije protokatehinske kiseline



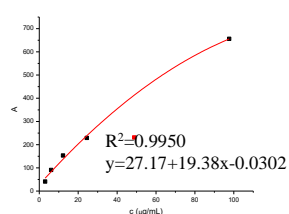
Grafik 9.13. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja siringinske kiseline u ekstraktima bokvica: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije siringinske kiseline



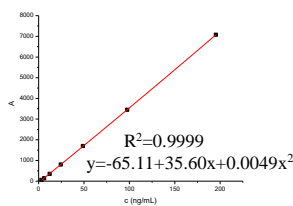
Grafik 9.14. Kalibraciona kriva vanilinske kiseline korišćena za određivanje sadržaja vanilinske kiseline u PALM, PALV, PARV, PHOM, PHOV, PLAM, PLAV, PMAV, PMEV: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije vanilinske kiseline



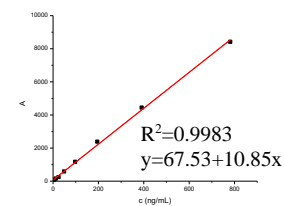
Grafik 9.15. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja vanilinske kiseline u PARM, PMAM, PMEM: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije vanilinske kiseline



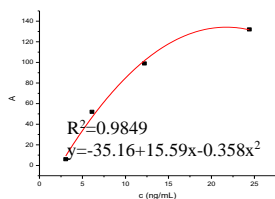
Grafik 9.16. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja ametoflavona u ekstraktima bokvica: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije ametoflavona



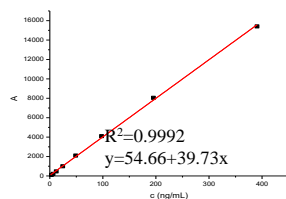
Grafik 9.17. Kalibraciona kriva apigenina korišćena za određivanje sadržaja apigenina u ekstraktima bokvica: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije apigenina



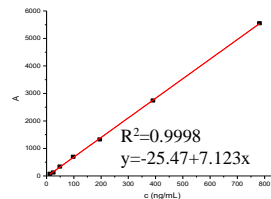
Grafik 9.18. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja apigenin-7-O-glukoziida u ekstraktima bokvica: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije apigenin-7-O-glukoziida



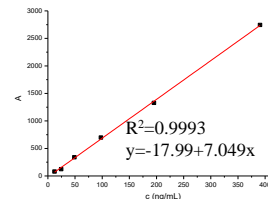
Grafik 9.19. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja apiina u ekstraktima bokvica: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije apiina



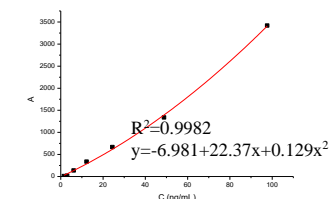
Grafik 9.20. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja krizoeriola u ekstraktima bokvica: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije krizoeriola



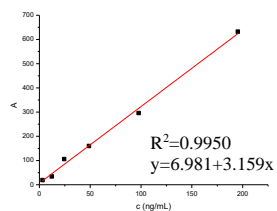
Grafik 9.21. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja kvercetin-3-O-heksozida u PALM, PALV, PHOM, PLAM, PLAV, PMAM: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije kvercetin-3-O-heksozida



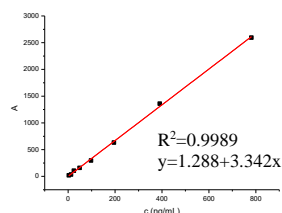
Grafik 9.22. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja kvercetin-3-O-heksozida u PARM, PARV, PHOV, PMAV: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije kvercetin-3-O-heksozida



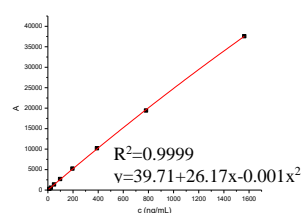
Grafik 9.23. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja kvercetin-3-O-heksozida u PMEM i PMEV: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije kvercetin-3-O-heksozida



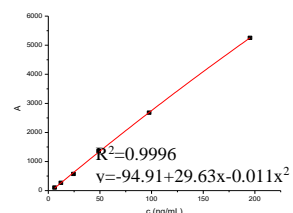
Grafik 9.24. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja kemferol-3-O-glukoziada u PALM, PARM, PARV, PHOM, PHOV, PLAV: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije kemferol-3-O-glukoziada



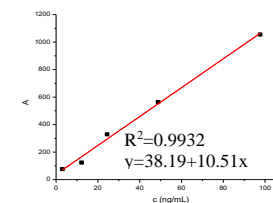
Grafik 9.25. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja kemferol-3-O-glukoziada u PALV, PMAM, PMAV, PMEM, PMEVI: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije kemferol-3-O-glukoziada



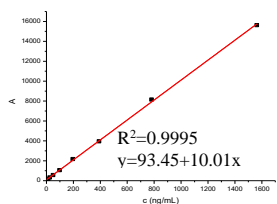
Grafik 9.26. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja luteolina u PALM, PALV, PARM, PARV, PHOM, PHOV, PLAM, PLAV: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije luteolina



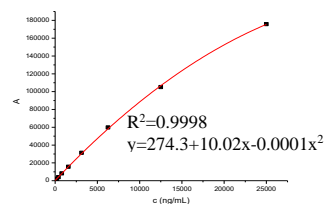
Grafik 9.27. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja luteolina u PMAM, PMAV, PMEM, PMEVI: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije luteolina



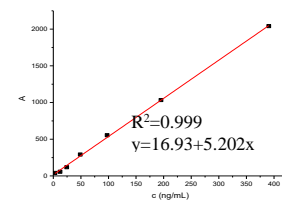
Grafik 9.28. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja luteolin-7-O-glukoziada u PMEM, PMEVI: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije luteolin-7-O-glukoziada



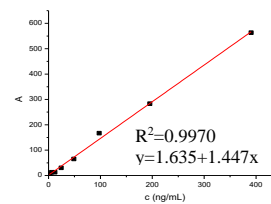
Grafik 9.29. Kalibraciona kriva luteolin-7-O-glukoziada korišćena za određivanje sadržaja l u PALM, PALV, PARM, PARV, PMAV: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije luteolin-7-O-glukoziada



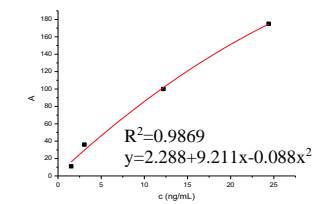
Grafik 9.30. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja luteolin-7-O-glukoziada u PALM, PALV, PARM, PARV, PMEM, PMEVI: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije luteolin-7-O-glukoziada



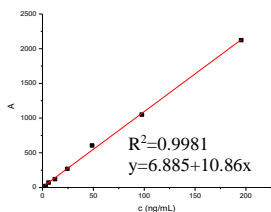
Grafik 9.31. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja rutina u PHOM, PHOV, PMAM, PMAV: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije rutina



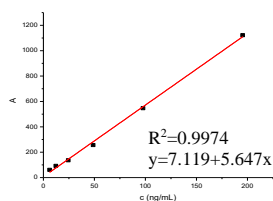
Grafik 9.32. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja rutina u PALM, PALV, PARM, PARV, PMEM, PMAV: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije rutina



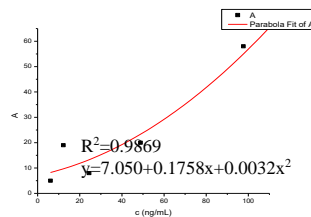
Grafik 9.33. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja viteksina u PALM, PALV, PARM, PARV, PHOM, PHOV, PLAM, PLAV, PMAM, PMAV: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije viteksina



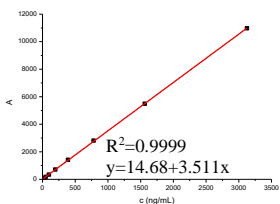
Grafik 9.34. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja eskuletina u ekstraktima bokvica: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije eskuletina



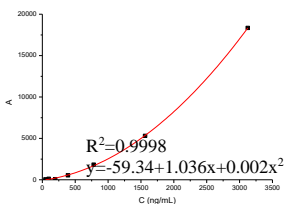
Grafik 9.35. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja izoskopoletina u ekstraktima bokvica: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije izoskopoletina



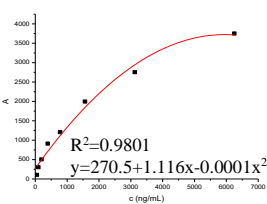
Grafik 9.36. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja umbeliferona u ekstraktima vrsta: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije umbeliferona



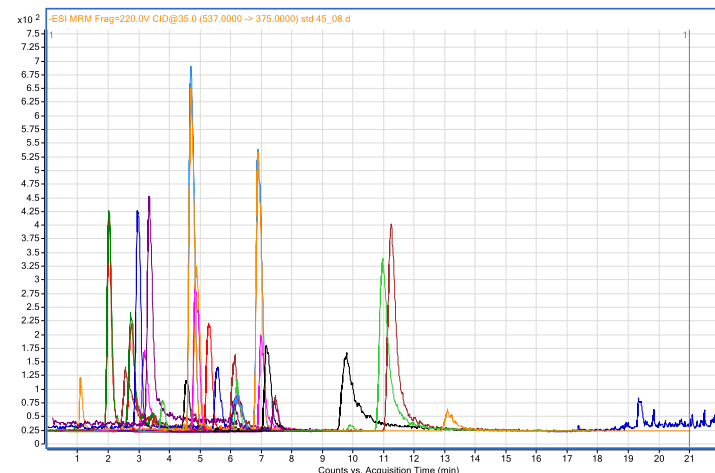
Grafik 9.37. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja hinske kiseline u ekstraktima bokvica: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije hinske kiseline



Grafik 9.38. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja ursolne kiseline u ekstraktima bokvica PALM, PALV, PARM, PARV, PLAM, PLAV, PMAM, PMAV, PMEM, PMEVI: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije ursolne kiseline



Grafik 9.39. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja ursolne kiseline u ekstraktima bokvica PHOM, PHOV: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije ursolne kiseline



Slika 9.1. (-) ESI MRM Hromatogram smeše standardnih jedinjenja pri koncentraciji 195 ng/mL

Tabela 60. Površine pikova i koncentracije detektovanih jedinjenja (fenolnih kiselina) očitanih sa kalibracionih krivih u ekstraktima bokvica

Jedinjenja		2,5-Dihidroksi-benzoeva kiselina		Ferulna kiselina		Hlorogenska kiselina		Kafena kiselina		p-OH-benzoeva kiselina		p-kumarinska kiselina		Protokatehinska kiselina		Siringinska kiselina		Vanilinska kiselina		
Uzorci*	P pika	ng/mL	P pika	ng/mL	P pika	ng/mL	P pika	ng/mL	P pika	ng/mL	P pika	ng/mL	P pika	ng/mL	P pika	ng/mL	P pika	ng/mL	P pika	ng/mL
PALM	356	27.40	912	72.94	36689	2697	2209	81.18	1453	64.18	1186	23.24	860	43.20	79	25.96	2330	1638		
PALV	372	28.65	1082	86.26	42394	3117	3612	132.6	1138	49.42	1740	38.24	940	47.16	94	30.64	2280	1603		
PARM	1007	78.30	819	65.66	4665	337	2706	99.38	3411	155.9	4236	105.9	727	36.62	448	141.1	130	111.7#		
PARV	507	39.21	626	50.55	4642	335	2258	82.97	2267	102.3	2909	69.92	578	29.24	261	82.78	452	334.5		
PHOM	491	37.96	833	66.76	76836	5655	5310	194.8	3288	150.2	14176	375.2	2351	117.0	112	36.26	745	574.8		
PHOV	687	53.28	1560	123.7	2066	145	7402	271.4	3015	137.4	15412	408.6	1533	76.50	171	54.68	955	683.6		
PLAM	340	26.15	1079	86.02	49343	3629	2351	86.38	1968	88.31	2398	56.11	1103	55.22	107	34.70	1307	942.6		
PLAV	337	25.92	1165	92.76	53424	3930	3168	116.3	1386	61.04	2361	55.22	869	43.64	95	30.96	1285	912.7		
PMAM	233	17.79	510	41.46	50	20.6	3002	110.2	1782	79.59	603	13.06	832	41.81	193	61.55	125	109.7#		
PMAV	206	15.68	491	39.97	18	15.48	3060	112.3	1179	51.34	680	14.93	645	32.56	140	45.00	436	323.4		
PMEM	373	28.73	587	47.49	292	59.37	6339	232.4	2273	102.6	617	13.40	1839	91.64	463	145.8	203	193.9#		
PMEV	501	38.60	645	52.03	236	50.39	5789	212.3	1919	86.01	798	17.79	1467	73.23	443	139.6	1017	726.6		

*Koncentracija ekstrakta korišćenog u analizi 10 mg/mL osim kada je drugačije naglašeno; # Koncentracija ekstrakta korišćenog u analizi 2 mg/mL

Tabela 61. Površine pikova i koncentracije detektovanih jedinjenja (flavonoida) očitanih sa kalibracionih krivih u ekstraktima bokvica

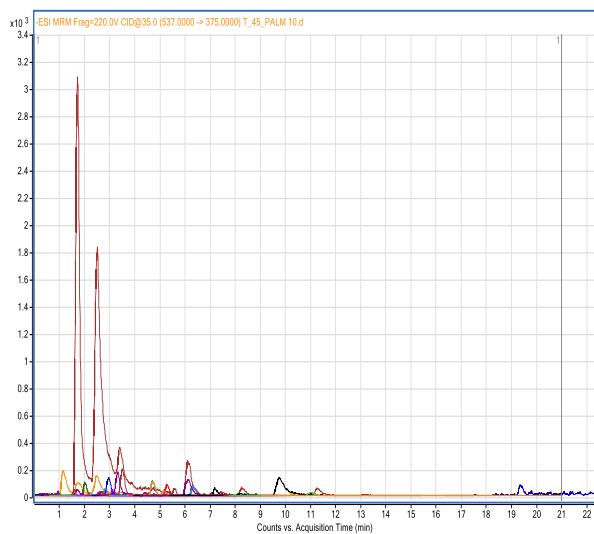
Jedinjenja		Ametoflavon#		Apigenin		Apigenin-7-O-glukozid		Apiin		Krizoeriol		Kvercetin-3-O-heksozid		Kemferol-3-O-glukozid		Luteolin		Luteolin-7-O-glukozid		
Uzorci*	P pika	ng/mL	P pika	ng/mL	P pika	ng/mL	P pika	ng/mL	P pika	ng/mL	P pika	ng/mL	P pika	ng/mL	P pika	ng/mL	P pika	ng/mL	P pika	ng/mL
PALM	85	6.004	495	15.70	670	55.55	16	0.547 #	1247	30.01	868	125.7	152	45.90	3954	150.8	4272	417.2		
PALV	115	8.420	2235	64.04	364	27.34	9	3.108	1918	46.90	732	106.4	67	19.66	20252	806.8	2439	234.2		
PARM	138	10.48	5698	158.4	1968	175.2	/	/	3644	90.35	1332	191.5	535	167.1	2654	100.4	6317	621.4		
PARV	188	16.09	1974	56.83	1631	144.2	/	/	1315	31.72	1317	189.4	470	146.6	1271	47.17	5524	542.2		
PHOM	/	/	1575	45.78	2323	208.0	8	2.352	13987	350.7	3579	506.1	610	190.9	7620	294.3	95789	10984		
PHOV	/	/	505	15.98	1393	122.2	/	/	7298	182.3	2449	350.0	470	146.6	5062	193.9	63509	6881		
PLAM	71	4.962	743	22.63	1790	158.8	107	27.24	1504	36.48	523	77.00	823	245.9	5328	204.3	42930	4502		
PLAV	76	5.329	2075	59.62	955	81.83	86	23.16	1742	42.47	384	57.49	277	85.47	12936	506.4	16898	1694		
PMAM	49	3.412	136	5.644	5462	497.4	9	3.236	11518	288.5	3084	436.6	1712	511.8	132	7.681	10582	1042		
PMAV	59	4.105	85	4.214	1999	178.1	/	/	4203	104.4	1405	201.9	705	210.5	214	10.47	5048	494.7		
PMEM	60	4.175	1776	51.35	526	42.27	9	3.108	2289	56.24	60	2.944#	57	16.67	345	14.93	891	81.16		
PMEV	61	4.246	558	17.46	252	17.01	/	/	1389	33.59	34	1.813#	56	16.37	235	11.18	794	71.93		

*Koncentracija ekstrakta korišćenog u analizi 10 mg/mL osim kada je drugačije naglašeno; #Koncentracija ekstrakta korišćenog u analizi 2 mg/mL.

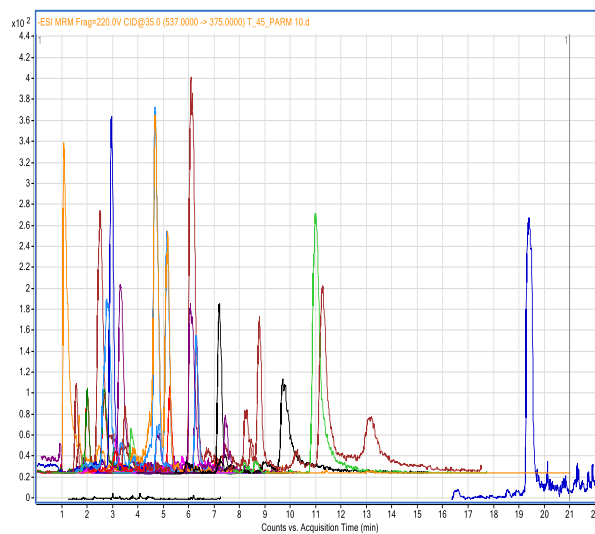
Tabela 62. Površine pikova i koncentracije detektovanih jedinjenja (flavonoida, kumarina, hinske i ursolne kiseline) očitanih sa kalibracionih krivih u ekstraktima bokvica

Jedinjenje														
Uzorci*	Rutin		Viteksin		Eskuletin		Izokopoletin		Umbeilferon		Hinska kiselina		Ursolna kiselina [#]	
	P pika	ng/mL	P pika	ng/mL	P pika	ng/mL	P pika	ng/mL	P pika	ng/mL	P pika	ng/mL	P pika	ng/mL
PALM	31	23.35	34	3.564	505	45.36	224	38.41	31	63.12	2714	768.8	456	375.4 [#]
PALV	25	18.63	19	1.847	499	44.80	/	/	12	21.46	1762	497.7	65	97.41 [#]
PARM	4	2.149 ^{\$}	41	4.387	405	36.11	/	/	/	/	4229	1200.3	11465	2411 [#]
PARV	14	10.00	61	6.819	227	19.63	/	/	21	43.93	3059	867.1	173	212.7 [#]
PHOM	1164	220.5	40	4.268	780	70.81	/	/	/	/	2716	769.4	2262	2174
PHOV	51	8.666	48	5.224	738	66.92	/	/	10	11.05	3627	1028	1274	769.6
PLAM	9	6.075	110	13.41	586	52.85	112	18.57	9 ^{\$}	9.453 ^{\$}	2061	582.8	268	277.8 [#]
PLAV	/	/	42	4.505	518	46.56	/	/	25 ^{\$}	52.16 ^{\$}	2242	634.4	71	106.9 [#]
PMAM	77	16.29	126	15.83	579	52.21	/	/	11	17.10	2307	652.9	1649	741.0 [#]
PMAV	45	6.380	88	10.32	435	38.88	/	/	/	/	5632	1600	190	225.7 [#]
PMEM	7	4.504	35	3.64	1540	141.1	534	93.31	17	34.16	1033	290.0	4549	1421 [#]
PMEV	8	5.290	/	/	966	88.02	/	/	13	23.62	4732	1343	130	175.7 [#]

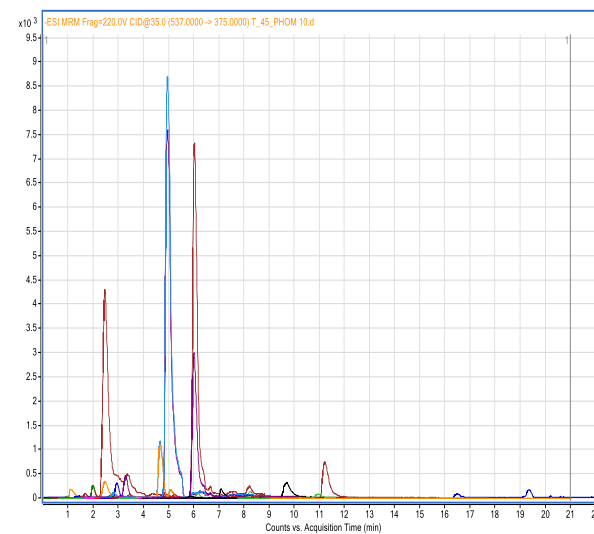
*Koncentracija ekstrakta korišćenog u analizi 10 mg/mL osim kada je drugačije naglašeno; [#]Koncentracija ekstrakta korišćenog u analizi 2 mg/mL; Koncentracija ekstrakta korišćenog u analizi 20 mg/mL;



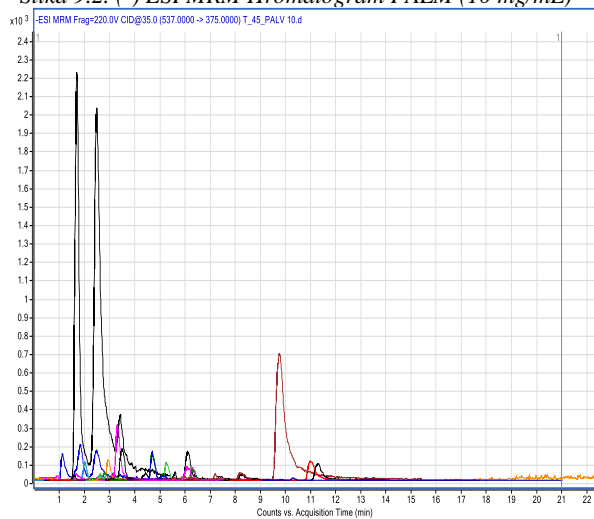
Slika 9.2. (-) ESI MRM Hromatogram PALM (10 mg/mL)



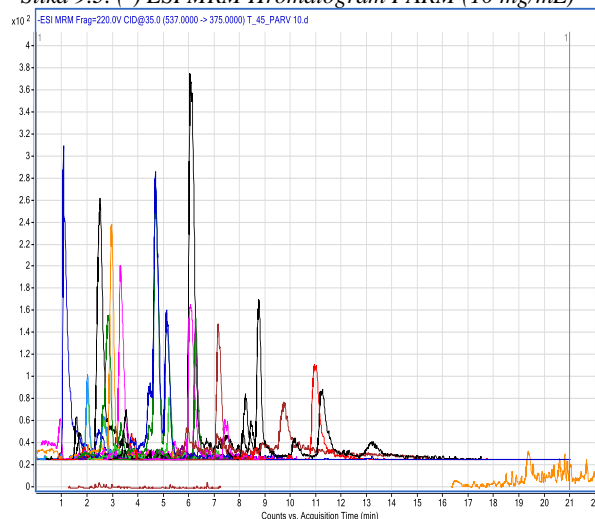
Slika 9.3. (-) ESI MRM Hromatogram PARM (10 mg/mL)



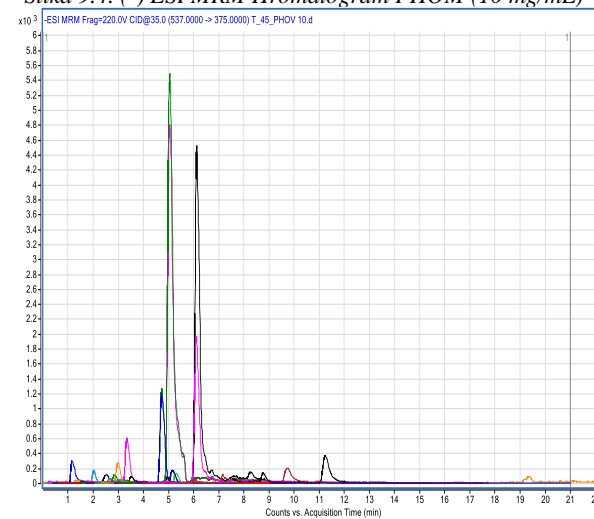
Slika 9.4. (-) ESI MRM Hromatogram PHOM (10 mg/mL)



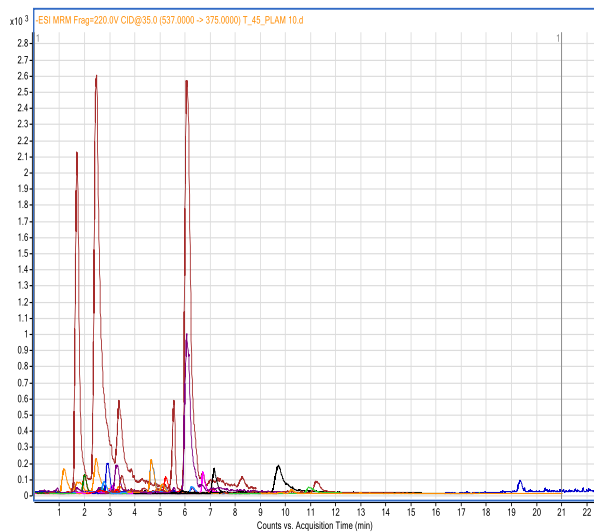
Slika 9.5. (-) ESI MRM Hromatogram PALV (10 mg/mL)



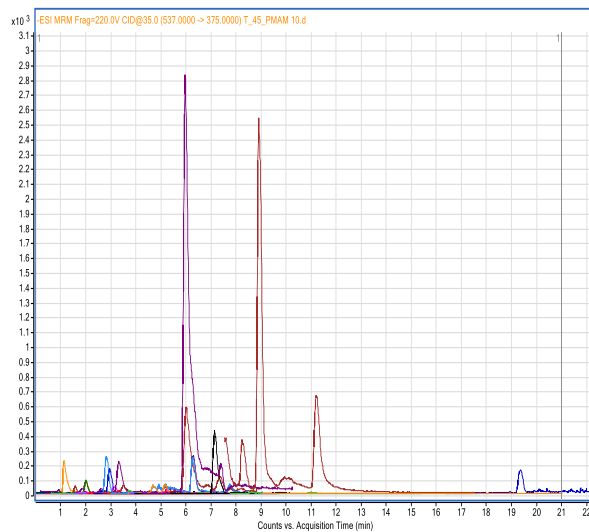
Slika 9.6. (-) ESI MRM Hromatogram PARV (10 mg/mL)



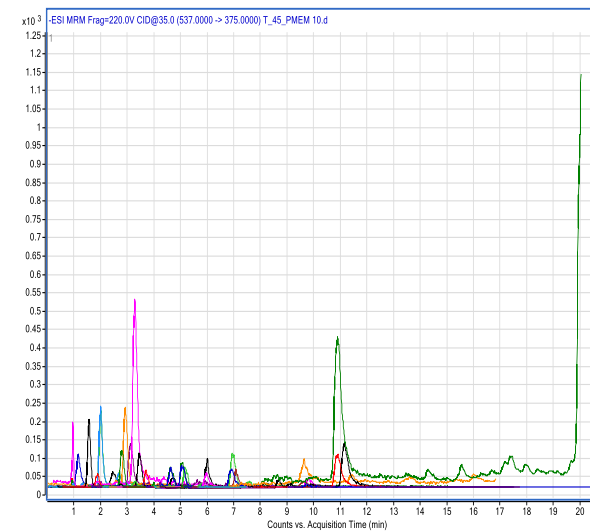
Slika 9.7. (-) ESI MRM Hromatogram PHOV (10 mg/mL)



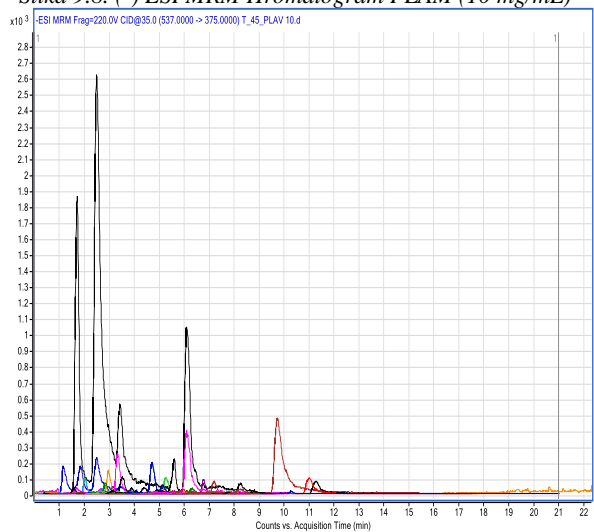
Slika 9.8. (-) ESI MRM Hromatogram PLAM (10 mg/mL)



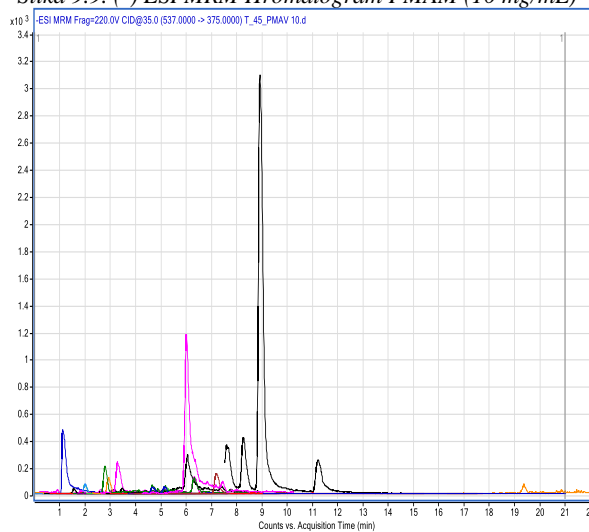
Slika 9.9. (-) ESI MRM Hromatogram PMAM (10 mg/mL)



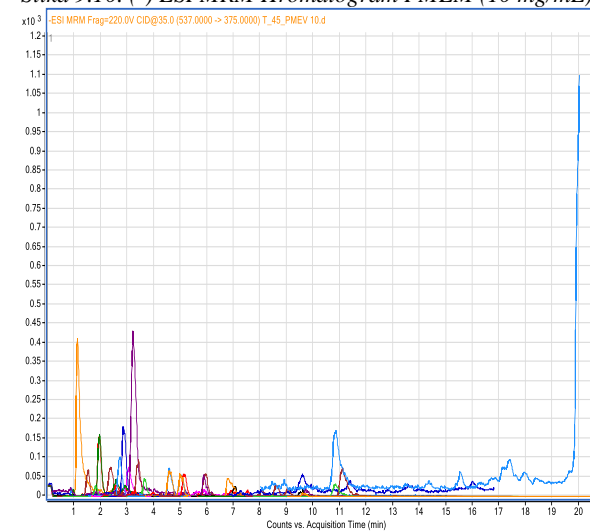
Slika 9.10. (-) ESI MRM Hromatogram PMEM (10 mg/mL)



Slika 9.11. (-) ESI MRM Hromatogram PLAV (10 mg/mL)



Slika 9.12. (-) ESI MRM Hromatogram PMAV (10 mg/mL)

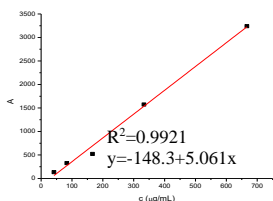


Slika 9.13. (-) ESI MRM Hromatogram PMEV (10 mg/mL)

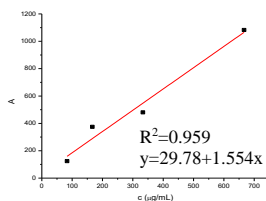
9.3.3. Određivanje odabranih jedinjenja u bokvicama primenom HPLC-DAD tehnike

Tabela 9.63. Površine pikova standardnih jedinjenja detektovanih u ekstraktima bokvica primenom HPLC-DAD tehnike koje su korišćene za konstruisanje kalibracionih krivih

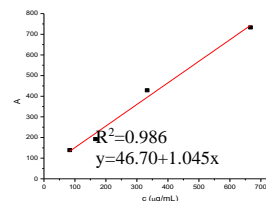
c (µg/mL)	Akteozid	Aukubin	Katalpol
666.67	3240.9	1082.4	733
333.34	1573.2	480.5	428.7
166.67	521.36	375.2	192.2
83.33	326.7	123.7	139.1
1.67	133.54		



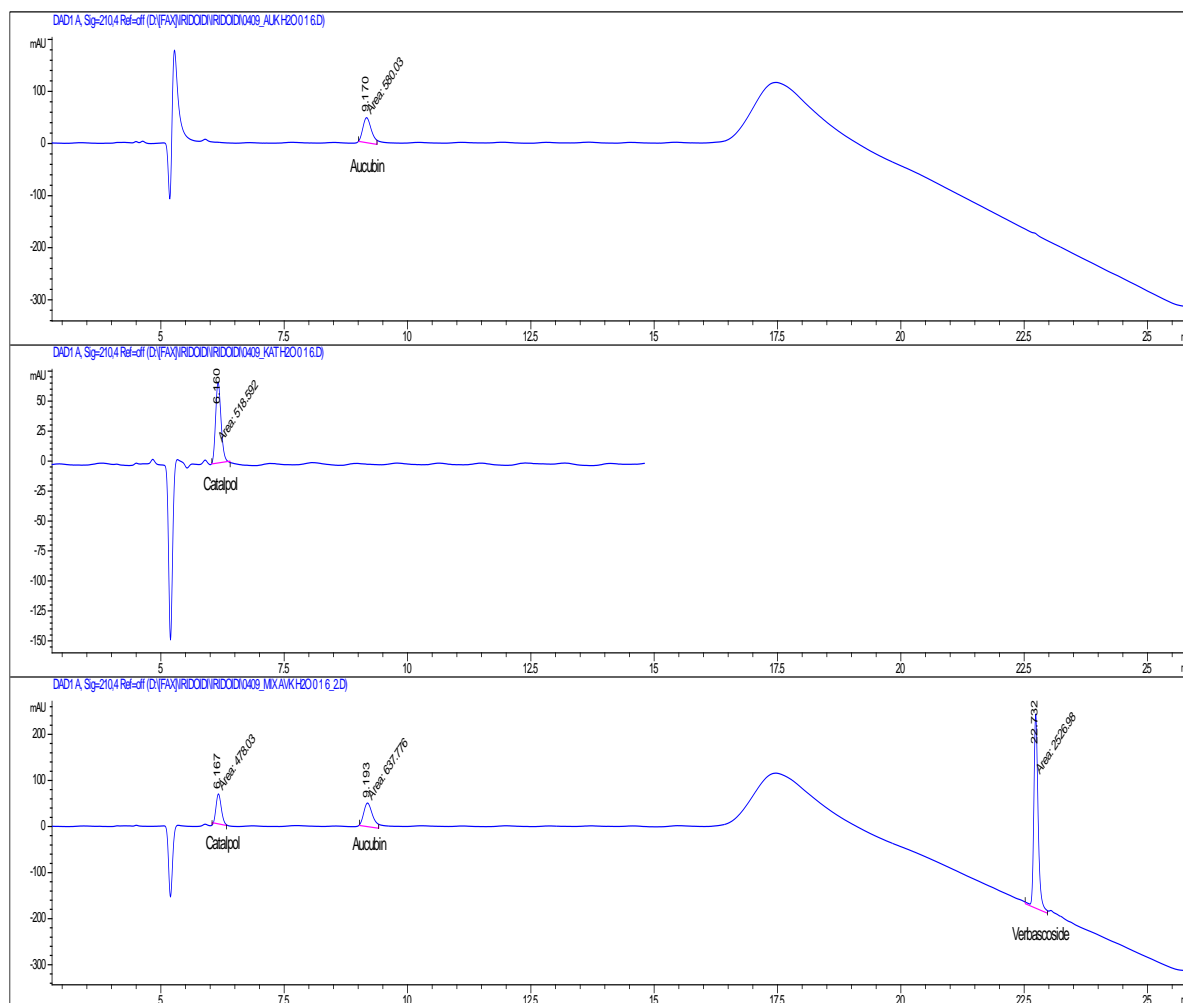
Grafik 9.40. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja akteozida u ekstraktima bokvica: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije akteozida



Grafik 9.41. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja aukubina u ekstraktima bokvica: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije aukubina



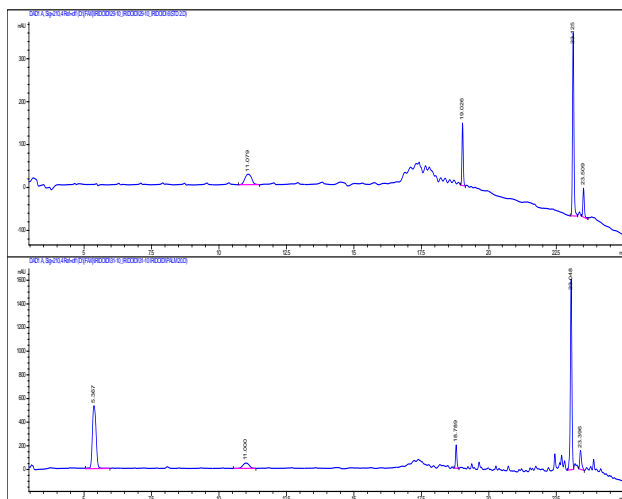
Grafik 9.42. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja katalpola u ekstraktima bokvica: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije katalpola



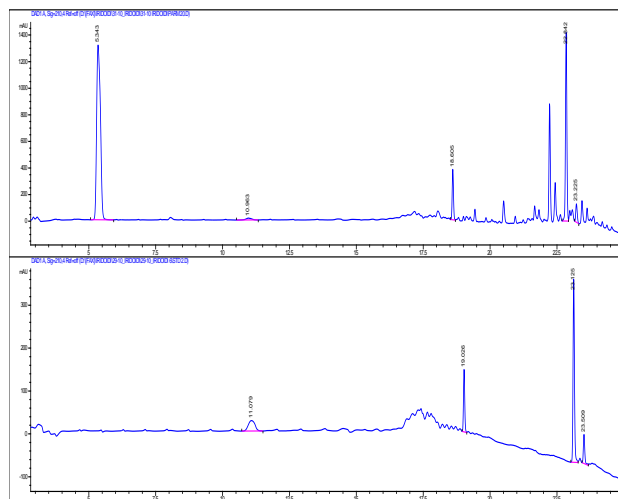
Slika 9.14. HPLC-DAD Hromatogram standardnih jedinjenja na 210 nm

Tabela 64. Površine pikova i koncentracije detektovanih jedinjenja očitanih sa kalibracionih krivih u ekstraktima bokvica primenom HPLC-DAD tehnike

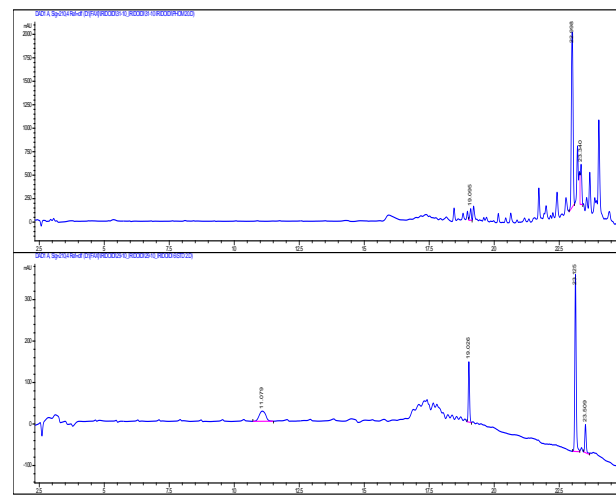
	c ekstrakta	Akteozid		Aukubin		Katalpol	
		P pika	µg/mL	P pika	µg/mL	P pika	µg/mL
PALM	20	6397.4	1293	684	420.9	739.3	662.8
PALM	4	1425.1	310.9	179.5	96.34	202	148.6
PALV	20	3629.2	746.4	679.9	418.3	554.4	485.7
PALV	4	773.9	182.2	157.4	82.12	168	116.1
PARM	20	5128.3	1042	1290.5	811.2	207.3	153.7
PARM	4	1103.8	247.4	254.5	144.6	0	
PARV	20	2085	441.3	937.3	583.9	92.7	44.02
PARV	4	544.9	136.9	256.1	145.6	0	
PHOM	20	8558	1720	459	276.2	0	
PHOM	4	3678.7	756.2	75.8	29.62	0	
PHOV	20	7075.9	1427	330.7	193.6	0	
PHOV	4	2135	451.1	74.6	28.84	0	
PLAM	20	4659.8	950.0	661.6	406.5	327.7	268.9
PLAM	4	971.1	221.2	0		0	
PLAV	20	2915.5	605.4	544.5	331.2	239.2	184.2
PLAV	4	549.3	137.8	141.3	71.76	39.40	
PMAM	20	6309.7	1276	286.9	165.4	0	
PMAM	4	1429.2	311.7	0		0	
PMAV	20	3949.4	809.6	149.3	76.91	0	
PMAV	4	888.6	204.9	0		0	
PMEM	20	8310.8	1671	1092	683.5	0	
PME	4	2932.5	608.7	282.3	162.5	0	
PMEV	20	8557.9	1720	1254	787.7	0	
PMEV	4	32401	669.5	283.5	163.3	0	



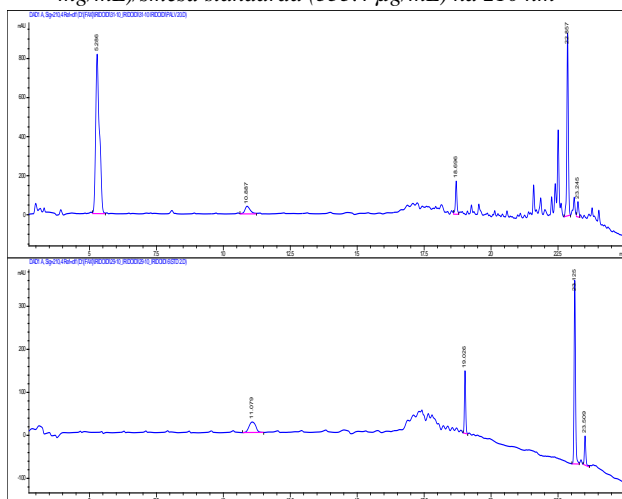
Slika 9.15. HPLC-DAD Hromatogram PALM (20 mg/mL)/smeša standarda (333.4 $\mu\text{g/mL}$) na 210 nm



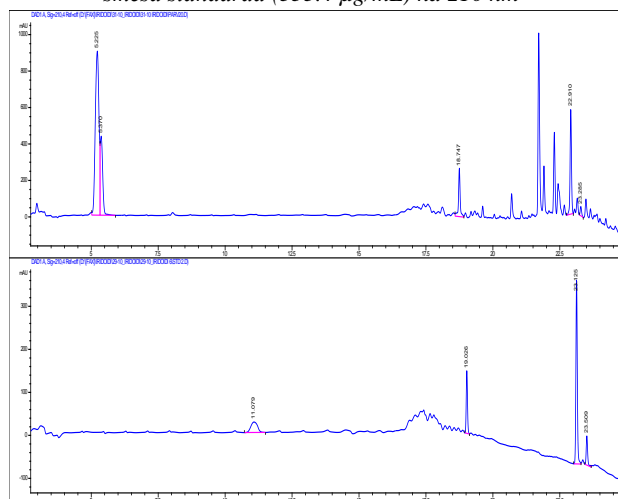
Slika 9.16. HPLC-DAD Hromatogram PARM (20 mg/mL)/smeša standarda (333.4 $\mu\text{g/mL}$) na 210 nm



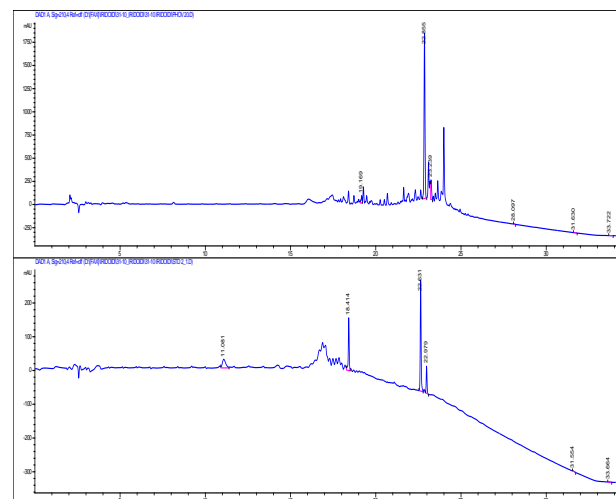
Slika 9.17. HPLC-DAD Hromatogram PHOM(20 mg/mL)/smeša standarda (333.4 $\mu\text{g/mL}$) na 210 nm



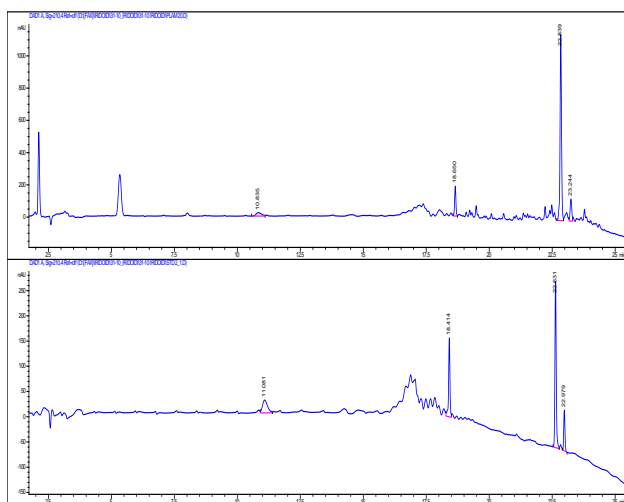
Slika 9.18. HPLC-DAD Hromatogram PALV(20 mg/mL)/smeša standarda (333.4 $\mu\text{g/mL}$) na 210 nm



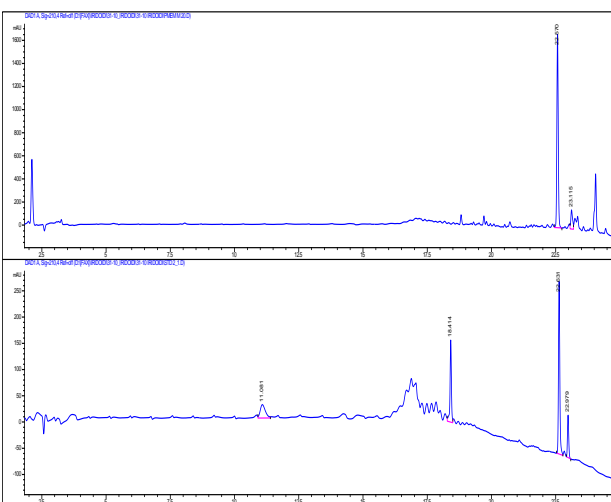
Slika 9.19. HPLC-DAD Hromatogram PARV(20 mg/mL)/smeša standarda (333.4 $\mu\text{g/mL}$) na 210 nm



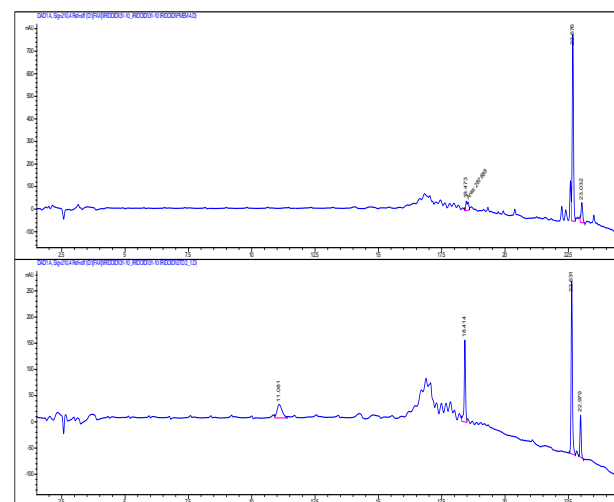
Slika 9.20. HPLC-DAD Hromatogram PHOV(20 mg/mL)/smeša standarda (333.4 $\mu\text{g/mL}$) na 210 nm



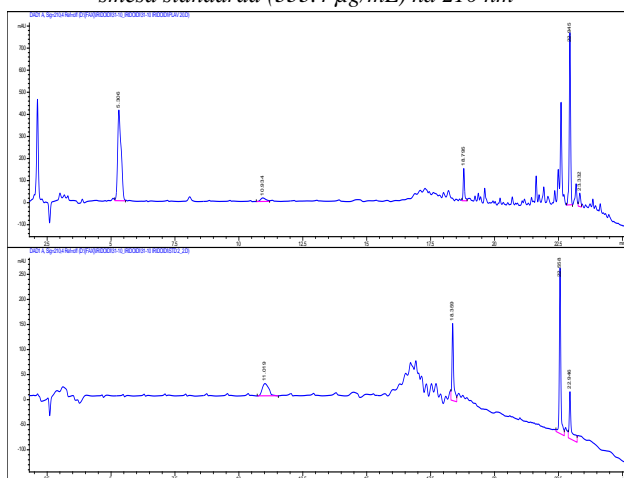
Slika 9.21. HPLC-DAD Hromatogram (20 mg/mL) PLAM /
smeša standarda (333.4 µg/mL) na 210 nm



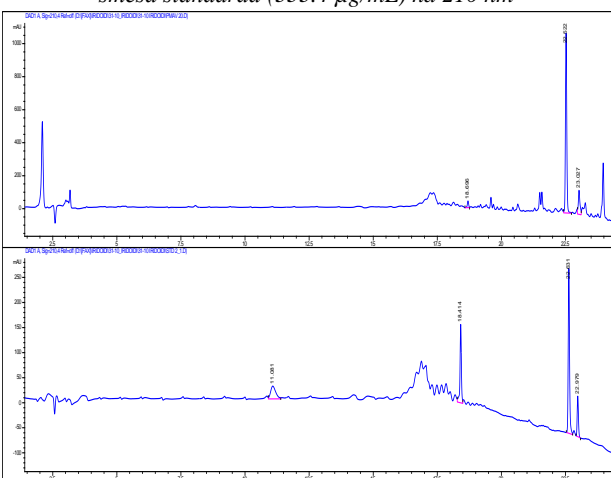
Slika 9.22. HPLC-DAD Hromatogram PMAM (20 mg/mL) /
smeša standarda (333.4 µg/mL) na 210 nm



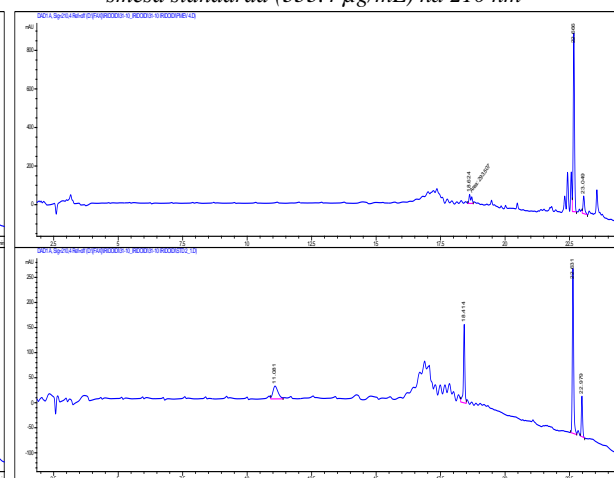
Slika 9.23. HPLC-DAD Hromatogram PMEM (20 mg/mL) /
smeša standarda (333.4 µg/mL) na 210 nm



Slika 9.24. HPLC-DAD Hromatogram PLAV (20 mg/mL) /
smeša standarda (333.4 µg/mL) na 210 nm



Slika 9.25. HPLC-DAD Hromatogram PMAV (20 mg/mL) /
smeša standarda (333.4 µg/mL) na 210 nm



Slika 9.26. HPLC-DAD Hromatogram PMEV (20 mg/mL) /
smeša standarda (333.4 µg/mL) na 210 nm

Tabela 9.65. Analiza glavnih komponenti (PCA) rezultata LC-MS/MS i HPLC-DAD kvantitativne analize ekstraktata bokvica - doprinos varijabli za 11 glavnih faktora opterećenja (loadings)

Variable	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Faktor 7	Faktor 8	Faktor 9	Faktor 10	Faktor 11
RU	0.712	0.036	0.362	0.101	0.247	-0.369	-0.381	-0.072	-0.013	-0.050	0.002
AMF	-0.626	-0.044	-0.409	0.435	0.125	-0.163	-0.163	-0.140	0.392	-0.017	-0.091
A7G	0.509	-0.514	-0.507	-0.168	0.366	-0.027	0.146	0.077	0.004	0.167	0.030
KRI	0.913	-0.161	-0.036	-0.080	0.221	-0.210	0.079	0.156	-0.009	0.067	0.069
K3H	0.850	-0.305	-0.113	0.096	0.148	-0.308	0.195	0.006	0.085	-0.004	0.026
API	-0.159	0.356	-0.238	0.772	0.350	0.070	-0.088	0.203	-0.028	-0.066	0.118
UK	0.004	0.488	-0.511	0.271	0.531	0.079	0.148	0.118	-0.288	-0.123	0.072
L7G	0.847	-0.050	0.418	0.188	0.025	0.112	-0.068	-0.214	0.014	-0.063	-0.054
K3G	0.481	-0.599	-0.486	-0.174	0.298	0.106	0.136	0.014	-0.033	0.146	-0.057
VIT	0.224	-0.683	-0.413	-0.308	0.270	0.307	0.098	-0.113	-0.012	-0.082	-0.145
HLK	0.164	-0.278	0.747	0.258	0.316	0.005	-0.389	-0.074	-0.097	0.018	0.066
SK	-0.102	0.796	-0.557	-0.036	0.023	0.101	-0.056	0.077	-0.002	0.154	-0.034
FK	0.099	-0.082	0.618	0.451	-0.227	0.378	0.444	-0.058	0.035	0.046	0.016
HK	0.138	-0.030	-0.484	0.162	-0.697	-0.205	-0.121	-0.073	-0.409	-0.062	0.012
KK	0.486	0.641	0.265	-0.230	-0.338	0.130	0.208	0.194	0.129	0.021	-0.005
ESC	0.155	0.727	0.219	-0.561	0.124	0.217	0.011	0.144	-0.019	-0.017	-0.004
2,5DBK	0.171	0.506	-0.252	0.757	-0.033	0.058	0.215	-0.098	-0.091	0.096	-0.029
p-KK	0.800	0.133	0.305	0.361	-0.173	0.016	0.209	-0.147	0.118	-0.093	0.020
PKK	0.631	0.551	0.467	-0.208	0.091	0.044	-0.150	-0.003	0.010	0.017	-0.065
p-OH-BK	0.639	0.491	-0.191	0.452	0.173	0.101	0.101	-0.240	0.028	0.010	-0.032
ISK	-0.280	0.540	0.160	-0.503	0.426	0.118	0.140	-0.152	0.006	-0.336	0.024
UBF	-0.591	0.161	0.347	-0.329	0.137	-0.349	0.292	-0.271	0.066	0.177	0.246
VK	-0.526	0.033	0.712	-0.017	0.233	-0.156	0.267	0.092	-0.167	0.084	-0.149
LUT	-0.166	-0.243	0.701	0.453	0.087	0.003	-0.045	0.443	0.102	0.015	-0.034
AP	-0.168	-0.438	0.345	0.019	0.089	0.714	-0.258	-0.146	-0.134	0.161	0.099
KAT	-0.595	-0.229	0.511	0.207	0.231	-0.297	0.223	-0.118	-0.254	0.009	-0.142
AKT	0.567	0.657	0.217	-0.325	-0.011	-0.151	-0.134	-0.039	-0.127	0.177	-0.066
AUK	-0.446	0.778	-0.179	0.124	0.217	0.028	-0.172	-0.142	0.075	0.194	-0.087
Eigenvalue	7.173	5.714	5.085	3.420	2.057	1.489	1.174	0.695	0.611	0.382	0.200
% Total	25.62	20.41	18.16	12.22	7.35	5.32	4.19	2.48	2.18	1.37	0.71
Cumulative	7.17	12.89	17.97	21.39	23.45	24.94	26.11	26.81	27.42	27.80	28.00
Cumulative	25.62	46.02	64.18	76.40	83.74	89.06	93.26	95.74	97.92	99.29	100.00

Oznake: AKT - akteozid, AMF - ameto flavon, AP - apiin, API - apigenin, A7G - apigenin-7-O-glukozid, AUK - aukubin, 2,5DBK - 2,5-dihidroksi-benzoeva kiselina, ESC - eskuletin, FK - ferulna kiselina, HLK - hlorogenska kiselina, HK - hinska kislina, ISK - izoskopoletin, KAT - katalpol, KK - kafena kiselina, KRI - krizoeriol, K3H - kvercetin-3-O-heksozid, K3G - kemferol-3-O-glukozid, LUT - luteolin, L7G - luteolin-7-O-glukozid, p-OH-BK - p-OH-benzoeva kiselina, pKK - p-kumarinska kiselina, PKK - protokatehinska kiselina, RU - rutin, SK - siringinska kiselina, VK - vanilinska kiselina, VIT - viteksin, UK - ursolna kiselina, UBF - umbeliferon.

9.3.4. Uticaj ekstrakata bokvica na produkciju PGE₂ i TXA₂Tabela 9.66. Uticaj ekstrakata bokvica na produkciju PGE₂ u nestimulisanim monocitima

	Radna c µg/mL	Odnos površine pika PGE ₂ i PGB ₂ (PGE ₂ /PGB ₂)			Odnos PGE ₂ /PGB ₂ u radnim probama i kontroli				p
		1	2	3	1	2	3	Srednja vrednost	
PALM	500.0	0.057	0.057	0.060	79.52	79.63	84.27	81.14 ± 2.711	0.001
Kontrola		0.070	0.074	0.071	97.71	103.0	99.32	100.0 ± 2.695	
PALV	500.0	0.056	0.041	0.053	73.50	53.88	69.07	71.29 ± 3.134	0.107
Kontrola		0.071	0.066	0.092	92.63	86.60	120.8	100.0 ± 18.24	
PARM	500.0	0.078	0.094	0.094	75.52	91.42	90.67	85.87 ± 8.967	0.106
Kontrola		0.094	0.108	0.107	91.41	104.7	103.90	100.0 ± 7.451	
PARV	500.0	0.042	0.040	0.031	68.19	65.20	50.70	66.69 ± 2.111	0.007
Kontrola		0.063	0.065	0.058	102.1	105.2	92.75	100.0 ± 6.471	
PHOM	500.0	0.071	0.063	0.000	99.68	88.36	0.000	94.02 ± 8.004	0.475
Kontrola		0.070	0.074	0.071	97.71	103.0	99.3	100.0 ± 2.695	
PHOV	500.0	0.030	0.039	0.031	47.58	62.94	49.82	53.45 ± 8.297	0.002
Kontrola		0.063	0.065	0.058	102.1	105.2	92.75	100.0 ± 6.471	
PLAM	500.0	0.075	0.090	0.102	72.18	86.70	98.26	79.44 ± 10.26	0.160
Kontrola		0.094	0.108	0.107	91.41	104.7	103.9	100.0 ± 7.451	
PLAV	500.0	0.062	0.056	0.040	81.93	74.21	51.96	78.07 ± 5.458	0.164
Kontrola		0.071	0.066	0.092	92.63	86.60	120.8	100.0 ± 18.24	
PMAM	500.0	0.078	0.084	0.073	75.23	80.93	70.81	75.66 ± 5.074	0.013
Kontrola		0.094	0.108	0.107	91.41	104.7	103.9	100.0 ± 7.451	
PMAV	500.0	0.041	0.050	0.044	66.42	81.32	70.91	72.88 ± 7.644	0.010
Kontrola		0.063	0.065	0.058	102.1	105.2	92.75	100.0 ± 6.471	
PMEM	500.0	0.041	0.056	0.037	57.74	78.79	51.99	54.86 ± 4.067	0.012
Kontrola		0.070	0.074	0.071	97.71	103.0	99.32	100.0 ± 2.695	
PMEV	500.0	0.036	0.025	0.042	57.69	41.01	67.99	62.84 ± 7.282	0.027
Kontrola		0.063	0.065	0.058	102.1	105.2	92.75	100.0 ± 6.471	

Tabela 9.67. Uticaj ekstrakata bokvica na produkciju TXA₂ u nestimulisanim monocitima

	Radna c µg/mL	Odnos površine pika TXA ₂ i PGB ₂ (TXA ₂ /PGB ₂)			Odnos TXA ₂ /PGB ₂ u radnim probama i kontroli				p
		1	2	3	1	2	3	Srednja vrednost	
PALM	500.0	0.085	0.114	0.098	80.75	108.8	92.98	86.86 ± 8.647	0.318
Kontrola		0.107	0.103	0.095	101.9	98.08	90.25	100.0 ± 2.712	
PALV	500.0	0.055	0.019	0.057	88.98	30.52	92.91	90.95 ± 2.782	0.522
Kontrola		0.021	0.056	0.068	34.09	90.22	109.78	100.0 ± 13.84	
PARM	500.0	0.100	0.114	0.119	79.03	90.07	93.91	87.67 ± 7.728	0.169
Kontrola		0.118	0.141	0.121	93.03	111.4	95.6	100.0 ± 9.917	
PARV	500.0	0.046	0.062	0.016	61.00	81.08	21.05	71.04 ± 14.20	0.188
Kontrola		0.068	0.079	0.074	89.81	103.16	96.84	100.0 ± 6.680	
PHOM	500.0	0.080	0.070	0.081	76.10	66.16	76.98	73.08 ± 6.011	0.008
Kontrola		0.107	0.103	0.095	101.9	98.08	90.25	100.0 ± 2.712	
PHOV	500.0	0.075	0.058	0.060	98.08	76.50	78.42	77.46 ± 1.357	0.068
Kontrola		0.068	0.079	0.074	89.81	103.2	96.84	100.0 ± 6.680	
PLAM	500.0	0.121	0.101	0.100	95.74	79.55	79.11	79.33 ± 0.311	0.069
Kontrola		0.118	0.141	0.121	93.03	111.4	95.6	100.0 ± 9.917	
PLAV	500.0	0.047	0.051	0.008	75.39	83.30	12.86	79.34 ± 5.592	0.251
Kontrola		0.021	0.056	0.068	34.09	90.22	109.78	100.0 ± 13.83	
PMAM	500.0	0.098	0.120	0.083	77.30	94.60	65.56	71.43 ± 8.303	0.049
Kontrola		0.118	0.141	0.121	93.03	111.4	95.6	100.0 ± 9.917	
PMAV	500.0	0.071	0.087	0.071	93.55	114.03	93.24	93.40 ± 2.186	0.284
Kontrola		0.068	0.079	0.074	89.81	103.16	96.84	100.0 ± 6.680	
PMEM	500.0	0.090	0.090	0.065	85.67	85.90	61.70	85.79 ± 0.162	0.085
Kontrola		0.107	0.103	0.095	101.9	98.08	90.25	100.0 ± 2.712	
PMEV	500.0	0.033	0.071	0.066	43.65	93.93	86.86	90.39 ± 5.000	0.182
Kontrola		0.068	0.079	0.074	89.81	103.2	96.84	100.0 ± 6.680	

Tabela 9.68. Uticaj ekstrakata bokvica na produkciju PGE₂ u LPS-stimulisanim monocitima

	Radna c µg/mL	Odnos površine pika PGE ₂ i PGB ₂ (PGE ₂ /PGB ₂)						Odnos PGE ₂ /PGB ₂ u radnim probama i kontroli						Srednja vrednost	p
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6		
PALM	500.0	0.284	0.267	0.273	0.252	0.254		69.15	64.79	66.26	61.19	61.63		63.47 ± 2.458	6.46E-07
Kontrola		0.402	0.424	0.329	0.409	0.410		97.74	103.2	79.94	99.39	99.71		100.0 ± 2.663	
PALV	500.0	0.239	0.270	0.281	0.290	0.261	0.243	67.90	76.77	79.91	82.39	74.00	69.14	75.02 ± 5.791	9.590E-06
Kontrola		0.344	0.368	0.354	0.367	0.334	0.340	97.73	104.4	100.6	104.2	94.84	96.64	100.0 ± 4.710	
PARM	500.0	0.396	0.308	0.299	0.325	0.308		96.28	74.90	72.63	78.94	74.85		75.33 ± 2.629	9.02E-06
Kontrola		0.402	0.424	0.329	0.409	0.410		97.74	103.2	79.94	99.39	99.71		100.0 ± 2.663	
PARV	500.0	0.237	0.253	0.237	0.266	0.273	0.304	67.21	71.77	67.25	75.62	77.56	86.45	71.88 ± 4.732	4.74E-06
Kontrola		0.344	0.368	0.354	0.367	0.334	0.340	97.73	104.4	100.6	104.2	94.84	96.64	100.0 ± 4.710	
PHOM	500.0	0.075	0.071	0.058	0.076	0.098		71.645	68.02	56.14	72.72	94.09		67.13 ± 7.598	0.002
Kontrola		0.083	0.102	0.108	0.103	0.105	0.102	80.02	98.11	103.5	99.37	100.7	98.35	100.0 ± 2.193	
PHOV	500.0	0.320	0.297	0.319	0.343	0.306	0.306	77.79	72.22	77.45	83.40	74.34	74.33	76.59 ± 3.945	2.48E-06
Kontrola		0.402	0.424	0.329	0.409	0.410		97.74	103.2	79.94	99.39	99.71		100.0 ± 2.663	
PLAM	500.0	0.311	0.356	0.294	0.301			75.67	86.50	71.35	73.11			73.38 ± 6.049	3.66E-05
Kontrola		0.402	0.424	0.329	0.409	0.410		97.74	103.2	79.94	99.39	99.71		100.0 ± 2.663	
PLAV	500.0	0.341	0.407	0.285	0.295			96.96	115.54	80.84	83.88			87.23 ± 8.562	0.115
Kontrola		0.344	0.368	0.354	0.367	0.334	0.340	97.73	104.4	100.6	104.2	94.84	96.64	100.0 ± 4.710	
PMAM	500.0	0.311	0.325	0.000	0.287	0.258		75.56	79.02	0.000	69.74	62.61		71.73 ± 7.187	0.003
Kontrola		0.402	0.424	0.329	0.409	0.410		97.74	103.2	79.94	99.39	99.71		100.0 ± 2.663	
PMAV	500.0	0.302	0.286	0.305	0.286	0.303		85.90	81.32	86.72	81.24	86.05		84.24 ± 2.724	8.67E-05
Kontrola		0.344	0.368	0.354	0.367	0.334	0.340	97.73	104.4	100.6	104.2	94.84	96.64	100.0 ± 4.710	
PMEM	500.0	0.252	0.237	0.322	0.302	0.345		61.17	57.60	78.17	73.51	83.95		67.62 ± 8.348	0.006
Kontrola		0.402	0.424	0.329	0.409	0.410		97.74	103.2	79.94	99.39	99.71		100.0 ± 2.663	
PMEV	500.0	0.280	0.275	0.297	0.320	0.333		79.38	77.96	84.37	90.99	94.50		83.18 ± 5.891	0.005
Kontrola		0.344	0.368	0.354	0.367	0.334	0.340	97.73	104.4	100.6	104.2	94.84	96.64	100.0 ± 4.710	

Tabela 9.69. Uticaj ekstrakata bokvica na produkciju TXA₂ u LPS-stimulisanim monocitima

	Radna c µg/mL	Odnos površine pika TXA ₂ i PGB ₂ (TXA ₂ /PGB ₂)						Odnos TXA ₂ /PGB ₂ u radnim probama i kontroli						average	p
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6		
PALM	500.0	0.032	0.036	0.035	0.033	0.046		63.51	71.02	70.82	65.58	92.82		67.73 ± 3.78	0.000
Kontrola		0.054	0.053	0.031	0.047	0.047		107.2	105.4	62.87	93.88	93.51		100.0 ± 7.321	
PALV	500.0	0.050	0.054	0.056	0.055	0.028		91.23	97.81	100.8	99.52	50.75		96.19 ± 4.376	0.442
Kontrola		0.054	0.053	0.053	0.055	0.065	0.050	98.69	96.72	96.51	98.98	118.7	90.41	100.0 ± 9.661	
PARM	500.0	0.041	0.044	0.034	0.034	0.048		80.96	87.11	67.25	67.82	95.91		75.79 ± 9.85	0.008
Kontrola		0.054	0.053	0.031	0.047	0.047		107.2	105.4	62.87	93.88	93.51		100.0 ± 7.321	
PARV	500.0	0.061	0.057	0.057	0.062	0.061	0.066	111.4	103.2	103.7	111.7	111.5	120.0	110.3 ± 6.221	0.058
Kontrola		0.054	0.053	0.053	0.055	0.065	0.050	98.69	96.72	96.51	98.98	118.7	90.41	100.0 ± 9.661	
PHOM	500.0	0.013	0.028	0.037	0.022	0.028		31.36	68.36	89.62	53.47	69.64		63.82 ± 8.987	0.005
Kontrola		0.045	0.036	0.038	0.044			111.0	88.02	93.35	107.67			100.0 ± 11.06	
PHOV	500.0	0.039	0.050	0.043	0.045			77.95	100.3	85.06	89.02			84.01 ± 5.61	0.022
Kontrola		0.054	0.053	0.031	0.047	0.047		107.2	105.4	62.87	93.88	93.51		100.0 ± 7.321	
PLAM	500.0	0.024	0.023	0.039	0.020	0.022		48.80	45.89	77.50	39.90	43.22		44.45 ± 3.80	8.2E-05
Kontrola		0.054	0.053	0.031	0.047	0.047		107.2	105.4	62.87	93.88	93.51		100.0 ± 7.321	
PLAV	500.0	0.039	0.041	0.025	0.037	0.039	0.048	71.00	73.67	44.62	67.83	70.19	87.60	74.06 ± 7.851	0.001
Kontrola		0.054	0.053	0.053	0.055	0.065	0.050	98.69	96.72	96.51	98.98	118.7	90.41	100.0 ± 9.661	
PMAM	500.0	0.050	0.019	0.019	0.017	0.020		99.58	37.00	38.10	33.96	39.29		37.09 ± 2.28	1.7E-04
Kontrola		0.054	0.053	0.031	0.047	0.047		107.2	105.4	62.87	93.88	93.51		100.0 ± 7.321	
PMAV	500.0	0.044	0.045	0.048	0.061	0.050	0.046	80.22	81.99	86.44	110.8	90.40	84.27	83.23 ± 2.705	0.007
Kontrola		0.054	0.053	0.053	0.055	0.065	0.050	98.69	96.72	96.51	98.98	118.7	90.41	100.0 ± 9.661	
PMEM	500.0	0.020	0.042	0.036	0.038	0.029		39.63	84.19	72.06	76.39	57.49		68.65 ± 9.90	0.012
Kontrola		0.054	0.053	0.031	0.047	0.047		107.2	105.4	62.87	93.88	93.51		100.0 ± 7.321	
PMEV	500.0	0.042	0.044	0.054	0.015	0.033		76.74	79.34	97.27	28.06	59.30		71.79 ± 10.90	0.023
Kontrola		0.054	0.053	0.053	0.055	0.065	0.050	98.69	96.72	96.51	98.98	118.7	90.41	100.0 ± 9.661	

Tabela 9.70. Uticaj bokvica na produkciju PGE₂ u LPS stimulisanim makrofagama

	Radna c μg/mL	Odnos površine pika PGE ₂ i PGB ₂ (PGE ₂ /PGB ₂)			Odnos PGE ₂ /PGB ₂ u radnim probama i kontroli				p
		1	2	3	1	2	3	Srednja vrednost	
PALM	450.0	0.798	0.749	0.746	81.06	76.04	75.74	77.61 ± 2.988	0.022
Kontrola		1.061	0.973	0.922	107.7	98.74	93.57	100.0 ± 7.150	
PARM	450.0	0.770	0.683	0.965	78.16	69.30	97.99	73.73 ± 6.263	0.032
Kontrola		1.061	0.973	0.922	107.7	98.74	93.57	100.0 ± 7.150	
PLAM	450.0	0.723	0.753	0.909	73.38	76.39	92.26	74.89 ± 2.131	0.017
Kontrola		1.061	0.973	0.922	107.7	98.74	93.57	100.0 ± 7.150	
PMAM	450.0	0.847	0.964	0.782	85.95	97.84	79.38	82.67 ± 4.647	0.047
Kontrola		1.061	0.973	0.922	107.7	98.74	93.57	100.0 ± 7.150	

Tabela 9.71. Uticaj bokvica na produkciju TXA₂ u LPS stimulisanim makrofagama

	Radna c μg/mL	Odnos površine pika TXA ₂ i PGB ₂ (TXA ₂ /PGB ₂)			Odnos TXA ₂ /PGB ₂ u radnim probama i kontroli				p
		1	2	3	1	2	3	Srednja vrednost	
PALM	450.0	0.014	0.030	0.026	35.55	77.39	68.35	72.87 ± 6.394	0.031
Kontrola		0.037	0.037	0.042	96.66	95.02	108.3	100.0 ± 7.252	
PARM	450.0	0.024	0.024	0.032	61.22	62.41	83.16	61.81 ± 0.845	0.011
Kontrola		0.037	0.037	0.042	96.66	95.02	108.3	100.0 ± 7.252	
PLAM	450.0	0.031	0.034	0.034	81.17	89.06	88.77	86.34 ± 4.473	0.061
Kontrola		0.037	0.037	0.042	96.66	95.02	108.3	100.0 ± 7.252	
PMAM	450.0	0.032	0.053	0.037	82.90	136.4	95.94	89.42 ± 9.220	0.315
Kontrola		0.037	0.037	0.042	96.66	95.02	108.3	100.0 ± 7.252	

Tabela 9.72. Uticaj PALM na ekspresiju cPLA₂α, COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2, cPGES i TXAS mRNK u LPS-stimulisanim monocitima

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Uzorak	32.68	20.40	12.28	0.00020	0.00019	0.750	0.725 ± 0.036
	31.80	19.42	12.38	0.00019		0.700	
	32.89	20.11	12.78	0.00014		0.530	
Kontrola	31.86	19.51	12.35	0.00019	0.00027		1.000 ± 0.015
	30.09	18.21	11.88	0.00027		0.990	
	30.72	18.87	11.85	0.00027		1.010	
	COX-1	GAPDH					
Uzorak	24.55	12.4	12.15	0.00022	0.00026	1.032	1.243 ± 0.267
	24.28	12.29	11.99	0.00025		1.153	
	24.45	12.88	11.57	0.00033		1.543	
Kontrola	24.17	12.01	12.16	0.00022	0.00021	1.025	1.000 ± 0.038
	24.1	11.93	12.17	0.00022		1.018	
	24.15	11.89	12.26	0.00020		0.957	
	COX-2	GAPDH					
Uzorak	44.92	20.40	24.52	0.00000	0.00001	0.000	0.117 ± 0.076
	35.04	19.42	15.62	0.00002		0.171	
	37.17	20.11	17.06	0.00001		0.063	
Kontrola	33.90	19.51	14.39	0.00005	0.00012	0.400	1.000 ± 0.049
	31.33	18.21	13.12	0.00011		0.965	
	31.44	18.42	13.02	0.00012		1.035	
	mPGES-1	GAPDH					
Uzorak	26.86	14.43	12.43	0.00018	0.00015	1.594	1.340 ± 0.220
	26.65	13.82	12.83	0.00014		1.208	
	26.63	13.81	12.82	0.00014		1.217	
Kontrola	27.08	13.97	13.11	0.00011	0.00011	0.995	1.000 ± 0.103
	27.36	14.21	13.15	0.00011		0.968	
	27.04	14.15	12.89	0.00013		1.159	
	27.37	14.08	13.29	0.00010		0.878	
	mPGES-2	GAPDH					
Uzorak	26.57	20.26	6.310	0.01260	0.01183	0.625	0.586 ± 0.055
	24.66	18.87	5.790	0.01807		0.896	
	26.01	19.51	6.500	0.01105		0.548	
Kontrola	25.41	19.60	5.810	0.01782	0.02017	0.884	1.000 ± 0.103
	23.48	17.90	5.580	0.02091		1.036	
	23.94	18.42	5.520	0.02179		1.080	
	cPGES	GAPDH					
Uzorak	22.99	20.26	2.730	0.15073	0.13377	0.702	0.623 ± 0.093
	21.72	18.87	2.850	0.13870		0.646	
	22.67	19.51	3.160	0.11188		0.521	
Kontrola	21.77	19.60	2.170	0.22221	0.21477	1.035	1.000 ± 0.049
	19.84	17.90	1.940				
	20.69	18.42	2.270	0.20733		0.965	
	TXAS	GAPDH					
Uzorak	35.59	20.26	15.33	0.00002	0.00002	0.315	0.386 ± 0.124
	33.45	18.87	14.58	0.00004		0.529	
	34.84	19.51	15.33	0.00002		0.315	
Kontrola	33.36	19.60	13.76	0.00007	0.00007	0.934	1.000 ± 0.093
	31.90	17.90	14.00	0.00006			
	31.99	18.42	13.57	0.00008		1.066	

Tabela 9.73. Uticaj PALV na ekspresiju cPLA₂α, COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2, cPGES i TXAS mRNK u LPS-stimulisanim monocitima

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Uzorak	37.50	25.42	12.08	0.00023	0.00027	0.676 ± 0.112	0.125
	37.45	25.71	11.74	0.00029			
Kontrola	36.13	24.79	11.34	0.00039	0.00039	1.000 ± 0.225	
	36.03	24.99	11.04	0.00047			
	36.00	24.30	11.70	0.00030		0.776	
	COX-1	GAPDH					
Uzorak	37.77	24.38	13.39	0.00009	0.00010	0.645 ± 0.029	0.050
	25.07	11.79	13.28	0.00010			
Kontrola	25.07	11.80	13.27	0.00010		1.000 ± 0.151	
	25.99	13.14	12.85	0.00014	0.00015		
	25.08	12.63	12.45	0.00018		1.172	
	26.15	13.38	12.77	0.00014		0.939	
	COX-2	GAPDH					
Uzorak	34.11	24.38	9.730	0.00118	0.00039	0.112 ± 0.045	0.012
	35.81	11.79	24.02	0.00000			
Kontrola	36.67	11.80	24.87	0.00000		1.000 ± 0.200	
	34.74	13.14	21.60	0.00000	0.00000		
	33.7	12.63	21.07	0.00000		1.111	
	34.44	13.38	21.06	0.00000		1.119	
	mPGES-1	GAPDH					
Uzorak	34.84	23.57	11.27	0.00040	0.00016	1.460 ± 0.242	0.186
	25.17	10.23	14.94	0.00003			
Kontrola	24.96	10.36	14.60	0.00004		1.000 ± 0.127	
	27.02	11.91	15.11	0.00003	0.00002		
	26.66	11.27	15.39	0.00002		0.943	
	27.53	12.09	15.44	0.00002		0.911	
	mPGES-2	GAPDH					
Uzorak	34.05	23.57	10.48	0.00070	0.00774	1.877 ± 0.275	0.112
	16.86	10.23	6.630	0.01010			
Kontrola	16.69	10.36	6.330	0.01243		1.000 ± 0.110	
	19.48	11.91	7.570	0.00526	0.00600		
	18.6	11.27	7.330	0.00622		1.036	
	19.35	12.09	7.260	0.00652		1.087	
	cPGES	GAPDH					
Uzorak	29.79	23.57	6.220	0.01342	0.04750	1.028 ± 0.065	0.660
	14.25	10.23	4.020	0.06164			
Kontrola	14.25	10.36	3.890	0.06745		1.000 ± 0.035	
	15.91	11.91	4.000	0.06250	0.06282		
	15.31	11.27	4.040	0.06079		0.968	
	16.03	12.09	3.940	0.06515		1.037	
	TXAS	GAPDH					
Uzorak	36.29	23.57	12.72	0.00015	0.00005	1.408 ± 0.117	0.065
	27.26	10.23	17.03	0.00001			
Kontrola	27.56	10.36	17.2	0.00001		1.000 ± 0.088	
	29.45	11.91	17.54	0.00001	0.00001		
	28.80	11.27	17.53	0.00001		1.054	
	29.85	12.09	17.76	0.00000		0.899	

Tabela 9.74. Uticaj PARM na ekspresiju cPLA₂α, COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2, cPGES i TXAS mRNK u LPS-stimulisanim monocitima

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Uzorak	31.15	19.32	11.83	0.00027	0.00028	1.025	1.027 ± 0.025
	30.63	18.84	11.79	0.00028		1.053	
	31.42	19.56	11.86	0.00027		1.003	
Kontrola	31.86	19.51	12.35	0.00019	0.00027		1.000 ± 0.015
	30.09	18.21	11.88	0.00027		0.990	
	30.72	18.87	11.85	0.00027		1.010	
	COX-1	GAPDH					
Uzorak	30.57	19.32	11.25	0.00041	0.00044	1.639	1.508 ± 0.184
	29.94	18.44	11.5	0.00035		1.378	
	30.39	19.56	10.83	0.00055			
Kontrola	31.56	19.51	12.05	0.00024	0.00025	0.941	1.000 ± 0.083
	30.34	18.21					
	30.30	18.42	11.88	0.00027		1.059	
	COX-2	GAPDH					
Uzorak	31.68	19.32	12.36	0.00019	0.00018	1.635	1.564 ± 0.209
	31.50	18.84	12.66	0.00015		1.328	
	31.84	19.56	12.28	0.00020		1.728	
Kontrola	33.90	19.51			0.00012		1.000 ± 0.049
	31.33	18.21	13.12	0.00011		0.965	
	31.44	18.42	13.02	0.00012		1.035	
	mPGES-1	GAPDH					
Uzorak	26.85	13.88	12.97	0.00012	0.00013	1.096	1.125 ± 0.037
	26.68	13.73	12.95	0.00013		1.112	
	26.79	13.91	12.88	0.00013		1.167	
Kontrola	27.08	13.97	13.11	0.00011	0.00011	0.995	1.000 ± 0.103
	27.36	14.21	13.15	0.00011		0.968	
	27.04	14.15	12.89	0.00013		1.159	
	mPGES-2	GAPDH					
Uzorak	24.50	18.78	5.720	0.01897	0.02030	0.940	1.006 ± 0.098
	23.89	18.20	5.690	0.01937		0.960	
	24.64	19.17	5.470	0.02256		1.118	
Kontrola	25.41	19.60	5.810	0.01782	0.02017	0.884	1.000 ± 0.103
	23.48	17.90	5.580	0.02091		1.036	
	23.94	18.42	5.520	0.02179		1.080	
	cPGES	GAPDH					
Uzorak	22.35	18.78			0.23447		1.092 ± 0.427
	20.76	18.20	2.560	0.16958		0.790	
	20.91	19.17	1.740	0.29937		1.394	
Kontrola	21.77	19.60	2.170	0.22221	0.21477	1.035	1.000 ± 0.049
	19.84	17.90	1.940				
	20.69	18.42	2.270	0.20733		0.965	
	TXAS	GAPDH					
Uzorak	32.57	18.78	13.79	0.00007	0.00008	0.915	1.009 ± 0.131
	31.93	18.20	13.73	0.00007		0.954	
	32.62	19.17	13.45	0.00009		1.158	
Kontrola	33.36	19.60	13.76	0.00007	0.00008	0.934	1.000 ± 0.093
	31.90	17.90					
	31.99	18.42	13.57	0.00008		1.066	

Tabela 9.75. Uticaj PARV na ekspresiju cPLA₂α, COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2, cPGES i TXAS mRNK u LPS-stimulisanim monocitima

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>P</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Uzorak	38.50	25.98	12.52	0.00017	0.00017	0.440	0.428 ± 0.175
	38.41	25.06	13.35	0.00010		0.247	
	36.63	24.55	12.08	0.00023		0.597	
Kontrola	36.13	24.79	11.34	0.00039	0.00039	0.997	1.000 ± 0.225
	36.03	24.99	11.04	0.00047		1.227	
	36.00	24.30	11.7	0.00030		0.776	
	COX-1	GAPDH					
Uzorak	24.90	12.02	12.88	0.00013	0.00012	0.870	0.800 ± 0.161
	25.56	12.18	13.38	0.00009		0.615	
	25.18	12.37	12.81	0.00014		0.913	
Kontrola	25.99	13.14	12.85	0.00014	0.00015	0.888	1.000 ± 0.151
	25.08	12.63	12.45	0.00018		1.172	
	26.15	13.38	12.77	0.00014		0.939	
	COX-2	GAPDH					
Uzorak	33.82	12.02	21.80	0.00000	0.00000	0.670	0.880 ± 0.187
	33.49	12.18	21.31	0.00000		0.941	
	33.55	12.37	21.18	0.00000		1.030	
Kontrola	34.74	13.14	21.60	0.00000	0.00000	0.770	1.000 ± 0.200
	33.7	12.63	21.07	0.00000		1.111	
	34.44	13.38	21.06	0.00000		1.119	
	mPGES-1	GAPDH					
Uzorak	25.30	10.35	14.95	0.00003	0.00003	1.280	1.341 ± 0.066
	25.94	11.05	14.89	0.00003		1.334	
	25.75	10.94	14.81	0.00003		1.410	
Kontrola	27.02	11.91	15.11	0.00003	0.00002	1.145	1.000 ± 0.127
	26.66	11.27	15.39	0.00002		0.943	
	27.53	12.09	15.44	0.00002		0.911	
	mPGES-2	GAPDH					
Uzorak	17.07	10.35	6.720	0.00949	0.01017	1.581	1.695 ± 0.161
	17.73	11.05	6.680	0.00975		1.625	
	17.41	10.94	6.470	0.01128		1.880	
Kontrola	19.48	11.91	7.570	0.00526	0.00600	0.877	1.000 ± 0.110
	18.6	11.27	7.330	0.00622		1.036	
	19.35	12.09	7.260	0.00652		1.087	
	cPGES	GAPDH					
Uzorak	27.14	10.35	16.79	0.00001	0.05479		1.308 ± 0.154
	14.78	11.05	3.730	0.07536		1.200	
	14.43	10.94	3.490	0.08900		1.417	
Kontrola	15.91	11.91	4.000	0.06250	0.06282	0.995	1.000 ± 0.035
	15.31	11.27	4.040	0.06079		0.968	
	16.03	12.09	3.940	0.06515		1.037	
	TXAS	GAPDH					
Uzorak	14.78	10.35	4.430	0.04639	0.01547		1.749 ± 0.069
	27.89	11.05	16.84	0.00001		1.701	
	27.70	10.94	16.76	0.00001		1.798	
Kontrola	29.45	11.91	17.54	0.00001	0.00001	1.047	1.000 ± 0.088
	28.80	11.27	17.53	0.00001		1.054	
	29.85	12.09	17.76	0.00000		0.899	

Tabela 9.76. Uticaj PHOM na ekspresiju cPLA₂α, COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2, cPGES i TXAS mRNK u LPS-stimulisanim monocitima

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{-ΔCt}	Srednje 2 ^{-ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Uzorak	30.96	19.20	11.76	0.00029	0.00023	1.075	0.726 ± 0.057
	31.00	18.75	12.25	0.00021		0.766	
	30.51	18.10	12.41	0.00018		0.685	
Kontrola	31.86	19.51	12.35	0.00019	0.00027	0.714	1.000 ± 0.165
	30.09	18.21	11.88	0.00027		0.990	
	30.72	18.87	11.85	0.00027		1.010	
	COX-1	GAPDH					
Uzorak	30.02	19.20	10.82	0.00055	0.00047	2.291	1.762 ± 0.233
	29.82	18.75	11.07	0.00047		1.927	
	29.44	18.10	11.34	0.00039		1.598	
Kontrola	31.56	19.51	12.05	0.00024	0.00024	0.977	1.000 ± 0.090
	30.34	18.21	12.13	0.00022		0.924	
	30.30	18.42	11.88	0.00027		1.099	
	COX-2	GAPDH					
Uzorak	32.20	19.20	13.00	0.00012	0.00010	1.049	0.981 ± 0.096
	31.95	18.75	13.20	0.00011		0.913	
	31.73	18.10	13.63	0.00008		0.678	
Kontrola	33.90	19.51	14.39	0.00005	0.00012	0.400	1.000 ± 0.049
	31.33	18.21	13.12	0.00011		0.965	
	31.44	18.42	13.02	0.00012		1.035	
	mPGES-1	GAPDH					
Uzorak	26.43	13.78	12.65	0.00016	0.00016	1.369	1.369 ± 0.047
	26.53	13.83	12.70	0.00015		1.322	
	26.79	14.19	12.60	0.00016		1.417	
Kontrola	27.08	13.97	13.11	0.00011	0.00011	0.995	1.000 ± 0.103
	27.36	14.21	13.15	0.00011		0.968	
	27.04	14.15	12.89	0.00013		1.159	
	mPGES-2	GAPDH					
Uzorak	24.13	18.68	5.450	0.02288	0.01821	1.134	1.061 ± 0.283
	24.08	18.43	5.650	0.01992		0.987	
	24.30	17.90	6.400	0.01184		0.587	
Kontrola	25.41	19.60	5.810	0.01782	0.02017	0.884	1.000 ± 0.103
	23.48	17.90	5.580	0.02091		1.036	
	23.94	18.42	5.520	0.02179		1.080	
	cPGES	GAPDH					
Uzorak	20.91	18.68	2.230	0.21316	0.20263	0.992	0.943 ± 0.069
	20.81	18.43	2.380	0.19211		0.894	
	19.79	17.90					
Kontrola	21.77	19.60	2.170	0.22221	0.21477	1.035	1.000 ± 0.049
	19.84	17.90					
	20.69	18.42	2.270	0.20733		0.965	
	TXAS	GAPDH					
Uzorak	31.25	18.68	12.57	0.00016	0.00015	2.132	1.919 ± 0.300
	31.32	18.43	12.89	0.00013		1.707	
	30.22	17.90					
Kontrola	33.36	19.60	13.76	0.00007	0.00008	0.934	1.000 ± 0.093
	31.90	17.90					
	31.99	18.42	13.57	0.00008		1.066	

Tabela 9.77. Uticaj PHOV na ekspresiju cPLA₂α, COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2, cPGES i TXAS mRNK u LPS-stimulisanim monocitima

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{-ΔCt}	Srednje 2 ^{-ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Uzorak	36.36	25.08	11.28	0.00040	0.00036	1.039	0.939 ± 0.087
	36.57	25.08	11.49	0.00035		0.898	
	36.26	24.74	11.52	0.00034		0.880	
Kontrola	36.13	24.79	11.34	0.00039	0.00039	0.997	1.000 ± 0.225
	36.03	24.99	11.04	0.00047		1.227	
	36.00	24.30	11.70	0.00030		0.776	
	COX-1	GAPDH					
Uzorak	24.75	12.49	12.26	0.00020	0.00018	1.337	1.196 ± 0.134
	24.91	12.33	12.58	0.00016		1.071	
	24.69	12.25	12.44	0.00018		1.181	
Kontrola	25.99	13.14	12.85	0.00014	0.00015	0.888	1.000 ± 0.151
	25.08	12.63	12.45	0.00018		1.172	
	26.15	13.38	12.77	0.00014		0.939	
	COX-2	GAPDH					
Uzorak	34.17	12.49	21.68	0.00000	0.00000	0.728	0.618 ± 0.156
	34.53	12.33	22.20	0.00000		0.508	
	No Ct	12.25					
Kontrola	34.74	13.14	21.6	0.00000	0.00000	0.770	1.000 ± 0.200
	33.70	12.63	21.07	0.00000		1.111	
	34.44	13.38	21.06	0.00000		1.119	
	mPGES-1	GAPDH					
Uzorak	24.73	10.22	14.51	0.00004	0.00004	1.736	1.694 ± 0.166
	25.12	10.69	14.43	0.00005		1.835	
	25.42	10.71	14.71	0.00004		1.511	
Kontrola	27.02	11.91	15.11	0.00003	0.00002	1.145	1.000 ± 0.127
	26.66	11.27	15.39	0.00002		0.943	
	27.53	12.09	15.44	0.00002		0.911	
	mPGES-2	GAPDH					
Uzorak	17.11	10.22	6.890	0.00843	0.00878	1.405	1.463 ± 0.153
	17.36	10.69	6.670	0.00982		1.637	
	17.66	10.71	6.950	0.00809		1.348	
Kontrola	19.48	11.91	7.570	0.00526	0.00600	0.877	1.000 ± 0.110
	18.6	11.27	7.330	0.00622		1.036	
	19.35	12.09	7.260	0.00652		1.087	
	cPGES	GAPDH					
Uzorak	14.89	10.22	4.670	0.03928	0.06798		1.311 ± 0.109
	14.38	10.69	3.690	0.07748		1.233	
	14.23	10.71	3.520	0.08717		1.388	
Kontrola	15.91	11.91	4.000	0.06250	0.06282	0.995	1.000 ± 0.035
	15.31	11.27	4.040	0.06079		0.968	
	16.03	12.09	3.940	0.06515		1.037	
	TXAS	GAPDH					
Uzorak	26.92	10.22	16.70	0.00001	0.00002	1874	3.933 ± 0.442
	26.44	10.69	15.75	0.00002		3.620	
	26.23	10.71	15.52	0.00002		4.246	
Kontrola	29.45	11.91	17.54	0.00001	0.00001	1.047	1.000 ± 0.088
	28.80	11.27	17.53	0.00001		1.054	
	29.85	12.09	17.76	0.00000		0.899	

Tabela 9.78. Uticaj PLAM na ekspresiju cPLA₂α, COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2, cPGES i TXAS mRNK u LPS-stimulisanim monocitima

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Uzorak	30.61	18.70	11.91	0.00026	0.00025	0.969	0.309
	30.49	18.08				0.931 ± 0.055	
	30.50	18.47	12.03	0.00024		0.892	
Kontrola	31.86	19.51	12.35	0.00019	0.00027	0.990	1.000 ± 0.015
	30.09	18.21	11.88	0.00027		1.010	
	30.72	18.87	11.85	0.00027			
	COX-1	GAPDH					
Uzorak	30.55	18.70	11.85	0.00027	0.00026	1.122	0.352
	30.06	18.08	11.98	0.00025		1.065 ± 0.051	
	30.42	18.47	11.95	0.00025		1.047	
Kontrola	31.56	19.51	12.05	0.00024	0.00024	0.977	1.000 ± 0.090
	30.34	18.21	12.13	0.00022		0.924	
	30.30	18.42	11.88	0.00027		1.099	
	COX-2	GAPDH					
Uzorak	32.08	18.70	13.38	0.00009	0.00009	0.806	0.042
	31.97	18.47	13.5	0.00009		0.774 ± 0.045	
	33.90	19.51	14.39	0.00005		0.742	
Kontrola	31.33	18.21	13.12	0.00011	0.00012	0.965	1.000 ± 0.049
	31.44	18.42	13.02	0.00012		1.035	
	mPGES-1	GAPDH					
Uzorak	26.63	13.81	12.82	0.00014	0.00012	1.217	0.662
	27.21	14.24	12.97	0.00012		1.087 ± 0.135	
	26.87	13.69	13.18	0.00011		0.948	
Kontrola	27.08	13.97	13.11	0.00011	0.00011	0.995	1.000 ± 0.103
	27.36	14.21	13.15	0.00011		0.968	
	27.04	14.15	12.89	0.00013		1.159	
	27.37	14.08	13.29	0.00010	0.878		
	mPGES-2	GAPDH					
Uzorak	23.97	18.70	5.270	0.02592	0.02201	1.285	0.938
	23.89	18.29	5.600	0.02062		0.994 ± 0.039	
	23.87	18.19	5.680	0.01951		0.967	
Kontrola	25.41	19.60	5.810	0.01782	0.02017	0.884	1.000 ± 0.103
	23.48	17.90	5.580	0.02091		1.036	
	23.94	18.42	5.520	0.02179		1.080	
	cPGES	GAPDH					
Uzorak	20.87	18.70	2.170	0.22221	0.20126	1.035	0.370
	20.68	18.29	2.390	0.19078		0.937 ± 0.084	
	20.58	18.19	2.390	0.19078		0.888	
Kontrola	21.77	19.60	2.170	0.22221	0.21477	1.035	1.000 ± 0.049
	19.84	17.90	1.940	0.26062		0.965	
	20.69	18.42	2.270	0.20733			
	TXAS	GAPDH					
Uzorak	31.88	18.70			0.00007		0.549
	32.06	18.29	13.77	0.00007		0.944 ± 0.023	
	31.91	18.19	13.72	0.00007		0.961	
Kontrola	33.36	19.60	13.76	0.00007	0.00008	0.934	1.000 ± 0.093
	31.90	17.90				1.000 ± 0.093	
	31.99	18.42	13.57	0.00008		1.066	

Tabela 9.79. Uticaj PLAV na ekspresiju cPLA₂ α , COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2, cPGES i TXAS mRNK u LPS-stimulisanim monocitima

	Ct	Ct	Δ Ct	2^{Δ Ct	Srednje 2^{Δ Ct	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂	GAPDH				Srednja vrednost	
Uzorak	37.24	25.95	11.29	0.00040	0.00043	1.032	0.653
	36.55	24.97	11.58	0.00033		0.844	
	36.73	25.93	10.80	0.00056		1.449	
Kontrola	36.13	24.79	11.34	0.00039	0.00039	0.997	1.000 ± 0.225
	36.03	24.99	11.04	0.00047		1.227	
	36.00	24.30	11.7	0.00030		0.776	
	COX-1	GAPDH					
Uzorak	25.49	13.40	12.09	0.00023	0.00018	1.505	1.185 ± 0.280
	25.54	12.84	12.70	0.00015		0.986	
	24.97	12.38	12.59	0.00016		1.064	
Kontrola	25.99	13.14	12.85	0.00014	0.00015	0.888	1.000 ± 0.151
	25.08	12.63	12.45	0.00018		1.172	
	26.15	13.38	12.77	0.00014		0.939	
	COX-2	GAPDH					
Uzorak	35.60	13.40	22.20	0.00000	0.00000	0.508	0.497 ± 0.015
	35.10	12.84	22.26	0.00000		0.487	
	No Ct	12.38					
Kontrola	34.74	13.14	21.6	0.00000	0.00000	0.770	1.000 ± 0.200
	33.7	12.63	21.07	0.00000		1.111	
	34.44	13.38	21.06	0.00000		1.119	
	mPGES-1	GAPDH					
Uzorak	25.84	11.33	14.51	0.00004	0.000	1.602	1.462 ± 0.188
	25.70	10.83	14.87	0.00003		1.248	
	25.44	10.87	14.57	0.00004		1.537	
Kontrola	25.91	10.70	15.21	0.00003	0.000	0.986	1.000 ± 0.020
	25.92	10.75	15.17	0.00003		1.014	
	mPGES-2	GAPDH					
Uzorak	18.68	11.33	7.350	0.00613	0.007	1.226	1.315 ± 0.480
	18.65	10.83	7.820	0.00443		0.885	
	17.64	10.87	6.770	0.00916		1.833	
Kontrola	18.29	10.7	7.590	0.00519	0.005	1.038	1.000 ± 0.054
	18.45	10.75	7.700	0.00481		0.962	
	cPGES	GAPDH					
Uzorak	16.90	11.33	5.570	0.02105	0.064		0.921 ± 0.139
	14.53	10.83	3.700	0.07695		0.822	
	14.26	10.87	3.390	0.09539		1.019	
Kontrola	14.36	10.70	3.660	0.07911	0.094	0.845	1.000 ± 0.219
	13.96	10.75	3.210	0.10807		1.155	
	TXAS	GAPDH					
Uzorak	30.06	11.33	18.73	0.00000	0.000	0.459	0.594 ± 0.192
	28.89	10.83	18.06	0.00000		0.730	
	27.35	10.87	16.48	0.00001		2.183	
Kontrola	29.45	11.91	17.54	0.00001	0.000	1.047	1.000 ± 0.088
	28.80	11.27	17.53	0.00001		1.054	
	29.85	12.09	17.76	0.00000		0.899	

Tabela 9.80. Uticaj PMAM na ekspresiju *cPLA₂α*, *COX-1*, *COX-2*, *mPGES-1*, *mPGES-2*, *cPGES* i *TXAS* mRNK u LPS-stimulisanim monocitima

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	P
	<i>cPLA₂α</i>	GAPDH				Srednja vrednost	
Uzorak	30.98	18.77	12.21	0.00021	0.00021	0.787	0.005
	31.48	19.24	12.24	0.00021		0.771	
	30.88	19.14	11.74				
Kontrola	31.86	19.51	12.35	0.00019	0.00027		1.000 ± 0.015
	30.09	18.21	11.88	0.00027		0.990	
	30.72	18.87	11.85	0.00027		1.010	
	<i>COX-1</i>	GAPDH					
Uzorak	30.39	18.77	11.62	0.00032	0.00029	1.316	0.035
	31.03	19.24	11.79	0.00028		1.170	
	30.92	19.14	11.78	0.00028		1.178	
Kontrola	31.56	19.51	12.05	0.00024	0.00024	0.977	1.000 ± 0.090
	30.34	18.21	12.13	0.00022		0.924	
	30.30	18.42	11.88	0.00027		1.099	
	<i>COX-2</i>	GAPDH					
Uzorak	31.87	18.77	13.10	0.00011	0.00010	0.979	0.177
	32.62	19.24	13.38	0.00009		0.806	
	32.37	19.14	13.23	0.00010		0.894	
Kontrola	33.90	19.51	14.39	0.00005	0.00012		1.000 ± 0.049
	31.33	18.21	13.12	0.00011		0.965	
	31.44	18.42	13.02	0.00012		1.035	
	<i>mPGES-1</i>	GAPDH					
Uzorak	26.83	13.99	12.84	0.00014	0.00013	1.200	0.143
	26.74	13.85	12.89	0.00013		1.159	
	26.59	13.72	12.87	0.00013		1.175	
Kontrola	27.08	13.97	13.11	0.00011	0.00011	0.995	1.000 ± 0.103
	27.36	14.21	13.15	0.00011		0.968	
	27.04	14.15	12.89	0.00013		1.159	
	<i>mPGES-2</i>	GAPDH					
Uzorak	24.29	18.56	5.730	0.01884	0.01995	0.934	0.898
	24.51	18.94	5.570	0.02105		1.043	
	24.30	19.14					
Kontrola	25.41	19.60	5.810	0.01782	0.02017	0.884	1.000 ± 0.103
	23.48	17.90	5.580	0.02091		1.036	
	23.94	18.42	5.520	0.02179		1.080	
	<i>cPGES</i>	GAPDH					
Uzorak	20.34	18.56	1.780	0.29118	0.29632	1.356	0.017
	21.67	18.94					
	20.87	19.14	1.730	0.30145		1.404	
Kontrola	21.77	19.60	2.170	0.22221	0.21477	1.035	1.000 ± 0.049
	19.84	17.90					
	20.69	18.42	2.270	0.20733		0.965	
	<i>TXAS</i>	GAPDH					
Uzorak	31.74	18.56	13.18	0.00011	0.00009	1.397	0.286
	32.72	18.94	13.78	0.00007		0.921	
	32.39	19.14	13.25	0.00010		1.330	
Kontrola	33.36	19.60	13.76	0.00007	0.00008	0.934	1.000 ± 0.093
	31.90	17.90					
	31.99	18.42	13.57	0.00008		1.066	

Tabela 9.81. Uticaj PMAV na ekspresiju cPLA₂α, COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2, cPGES i TXAS mRNK u LPS-stimulisanim monocitima

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	P
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Uzorak	36.25	24.79	11.46	0.00035	0.00070	0.917	0.759
	36.34	24.99	11.35	0.00038		0.990	
	33.81	24.30	9.510	0.00137			
Kontrola	36.13	24.79	11.34	0.00039	0.00039	0.997	1.000 ± 0.225
	36.03	24.99	11.04	0.00047		1.227	
	36.00	24.30	11.70	0.00030		0.776	
	COX-1	GAPDH					
Uzorak	25.32	12.17	13.15	0.00011	0.00010	0.722	0.649 ± 0.091
	25.39	12.15	13.24	0.00010		0.678	
	25.30	11.75	13.55	0.00008		0.547	
Kontrola	25.99	13.14	12.85	0.00014	0.00015	0.888	1.000 ± 0.151
	25.08	12.63	12.45	0.00018		1.172	
	26.15	13.38	12.77	0.00014		0.939	
	COX-2	GAPDH					
Uzorak	33.84	12.17	21.67	0.00000	0.00000	0.733	0.681 ± 0.073
	No Ct	12.15					
	33.64	11.75	21.89	0.00000		0.629	
Kontrola	34.74	13.14	21.60	0.00000	0.00000	0.770	1.000 ± 0.200
	33.7	12.63	21.07	0.00000		1.111	
	34.44	13.38	21.06	0.00000		1.119	
	mPGES-1	GAPDH					
Uzorak	25.40	10.66	14.74	0.00004	0.00003	1.480	1.337 ± 0.488
	25.39	9.75	15.64	0.00002		0.793	
	25.16	10.65	14.51	0.00004		1.736	
Kontrola	27.02	11.91	15.11	0.00003	0.00002	1.145	1.000 ± 0.127
	26.66	11.27	15.39	0.00002		0.943	
	27.53	12.09	15.44	0.00002		0.911	
	mPGES-2	GAPDH					
Uzorak	17.83	10.66	7.170	0.00694	0.00761	1.157	1.268 ± 0.133
	16.83	9.75	7.080	0.00739		1.232	
	17.53	10.65	6.880	0.00849		1.415	
Kontrola	19.48	11.91	7.570	0.00526	0.00600	0.877	1.000 ± 0.110
	18.6	11.27	7.330	0.00622		1.036	
	19.35	12.09	7.260	0.00652		1.087	
	cPGES	GAPDH					
Uzorak	14.50	10.66	3.840	0.06983	0.05843	1.112	1.089 ± 0.032
	14.45	9.750	4.700	0.03847			
	14.55	10.65	3.900	0.06699		1.066	
Kontrola	15.91	11.91	4.000	0.06250	0.06282	0.995	1.000 ± 0.035
	15.31	11.27	4.040	0.06079		0.968	
	16.03	12.09	3.940	0.06515		1.037	
	TXAS	GAPDH					
Uzorak	27.39	10.66	16.73	0.00001	0.00001	1.835	2.002 ± 0.235
	36.66	9.750	26.91	0.00000			
	27.14	10.65	16.49	0.00001		2.168	
Kontrola	29.45	11.91	17.54	0.00001	0.00001	1.047	1.000 ± 0.088
	28.80	11.27	17.53	0.00001		1.054	
	29.85	12.09	17.76	0.00000		0.899	

Tabela 9.82. Uticaj PMEM na ekspresiju *cPLA₂α*, *COX-1*, *COX-2*, *mPGES-1*, *mPGES-2*, *cPGES* i *TXAS* mRNK u LPS-stimulisanim monocitima

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	P	
	<i>cPLA₂α</i>	GAPDH				Srednja vrednost		
Uzorak	32.43	20.61	11.82	0.00028	0.00031	1.032	0.994 ± 0.313	0.280
	30.79	19.54	11.25	0.00041				
	32.10	20.17	11.93	0.00026				
Kontrola	31.86	19.51	12.35	0.00019	0.00027	0.714	1.000 ± 0.165	
	30.09	18.21	11.88	0.00027				
	30.72	18.87	11.85	0.00027				
	<i>COX-1</i>	GAPDH						
Uzorak	23.84	12.42	11.42	0.00036	0.00028	1.712	1.119 ± 0.153	0.464
	24.38	12.2	12.18	0.00022				
	24.23	12.33	11.90	0.00026				
Kontrola	24.17	12.01	12.16	0.00022	0.00021	1.025	1.000 ± 0.038	
	24.1	11.93	12.17	0.00022				
	24.15	11.89	12.26	0.00020				
	<i>COX-2</i>	GAPDH						
Uzorak	34.61	20.61	14.00	0.00006	0.00007	0.525	0.559 ± 0.049	0.012
	33.99	20.17	13.82	0.00007		0.594		
Kontrola	31.33	18.21	13.12	0.00011	0.00012	0.965	1.000 ± 0.049	
	31.44	18.42	13.02	0.00012		1.035		
	<i>mPGES-1</i>	GAPDH						
Uzorak	26.29	13.97	12.32	0.00020	0.00021	1.653	1.642 ± 0.016	0.006
	26.2	13.86	12.34	0.00019		1.631		
	26.45	14.39	12.06	0.00023				
Kontrola	27.08	13.97	13.11	0.00011	0.00012	0.956	1.000 ± 0.099	
	27.36	14.21	13.15	0.00011		0.930		
	27.04	14.15	12.89	0.00013		1.114		
	27.37	14.08	13.29	0.00010		0.844		
	<i>mPGES-2</i>	GAPDH						
Uzorak	26.04	20.08	5.960	0.01606	0.01816	0.752	0.779 ± 0.038	0.027
	24.85	18.99	5.860	0.01722		0.806		
	25.11	19.55	5.560	0.02120		0.993		
Kontrola	25.41	19.60	5.810	0.01782	0.02135		1.000 ± 0.029	
	23.48	17.90	5.580	0.02091		0.979		
	23.94	18.42	5.520	0.02179		1.021		
	<i>cPGES</i>	GAPDH						
Uzorak	22.65	20.08	2.570		0.12065		0.562 ± 0.088	0.044
	22.21	18.99	3.220	0.10732		0.500		
	22.45	19.55	2.900	0.13397		0.624		
Kontrola	21.77	19.60	2.170	0.22221	0.21477	1.035	1.000 ± 0.049	
	19.84	17.90	1.940					
	20.69	18.42	2.270	0.20733		0.965		
	<i>TXAS</i>	GAPDH						
Uzorak	33.34	20.08	13.26	0.00010	0.00009	1.321	1.131 ± 0.061	0.256
	32.42	18.99	13.43	0.00009		1.174		
	33.09	19.55	13.54	0.00008		1.088		
Kontrola	33.36	19.60	13.76	0.00007	0.00008	0.934	1.000 ± 0.093	
	31.90	17.90	14.00	0.00006		0.791		
	31.99	18.42	13.57	0.00008		1.066		

Tabela 9.83. Uticaj PMEV na ekspresiju cPLA₂α, COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2, cPGES i TXAS mRNK u LPS-stimulisanim monocitima

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{-ΔCt}	Srednje 2 ^{-ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Uzorak	37.00	26.00	11.00	0.00049	0.05166	1.261	1.402 ± 0.199
	37.54	26.83	10.71	0.00060		1.542	
	36.13	33.43	2.700	0.15389			
Kontrola	36.13	24.79	11.34	0.00039	0.00039	0.997	1.000 ± 0.225
	36.03	24.99	11.04	0.00047		1.227	
	36.00	24.30	11.70	0.00030		0.776	
	COX-1	GAPDH					
Uzorak	24.95	12.62	12.33	0.00019	0.00016	1.274	1.064 ± 0.183
	24.42	11.71	12.71	0.00015		0.979	
	24.86	12.09	12.77	0.00014		0.939	
Kontrola	25.99	13.14	12.85	0.00014	0.00015	0.888	1.000 ± 0.151
	25.08	12.63	12.45	0.00018		1.172	
	26.15	13.38	12.77	0.00014		0.939	
	COX-2	GAPDH					
Uzorak	34.90	12.62	22.28	0.00000	0.00000	0.480	0.426 ± 0.168
	35.01	11.71	23.30	0.00000		0.237	
	34.15	12.09	22.06	0.00000		0.560	
Kontrola	34.74	13.14	21.60	0.00000	0.00000	0.770	1.000 ± 0.200
	33.7	12.63	21.07	0.00000		1.111	
	34.44	13.38	21.06	0.00000		1.119	
	mPGES-1	GAPDH					
Uzorak	25.77	10.93	14.84	0.00003	0.00003	1.381	1.381 ± 0.010
	24.77	9.94	14.83	0.00003		1.391	
	25.15	10.30	14.85	0.00003		1.372	
Kontrola	27.02	11.91	15.11	0.00003	0.00002	1.145	1.000 ± 0.127
	26.66	11.27	15.39	0.00002		0.943	
	27.53	12.09	15.44	0.00002		0.911	
	mPGES-2	GAPDH					
Uzorak	18.07	10.93	7.140	0.00709	0.00637	1.182	1.061 ± 0.112
	17.38	9.94	7.440	0.00576		0.960	
	17.62	10.30	7.320	0.00626		1.043	
Kontrola	19.48	11.91	7.570	0.00526	0.00600	0.877	1.000 ± 0.110
	18.6	11.27	7.330	0.00622		1.036	
	19.35	12.09	7.260	0.00652		1.087	
	cPGES	GAPDH					
Uzorak	14.30	10.93	3.370	0.09672	0.08704	1.540	1.386 ± 0.232
	13.77	9.94	3.830	0.07032		1.119	
	13.71	10.30	3.410	0.09408		1.498	
Kontrola	15.91	11.91	4.000	0.06250	0.06282	0.995	1.000 ± 0.035
	15.31	11.27	4.040	0.06079		0.968	
	16.03	12.09	3.940	0.06515		1.037	
	TXAS	GAPDH					
Uzorak	26.85	10.93	15.92	0.00002	0.00002	3.218	3.397 ± 0.350
	25.88	9.94	15.94	0.00002		3.174	
	25.98	10.30	15.68	0.00002		3.800	
Kontrola	29.45	11.91	17.54	0.00001	0.00001	1.047	1.000 ± 0.088
	28.80	11.27	17.53	0.00001		1.054	
	29.85	12.09	17.76	0.00000		0.899	

Tabela 9.84. Analiza glavnih komponenti na osnovu ispoljene aktivnosti bokvica – doprinos varijabli za 11 glavnih faktora opterećenja (loadings)

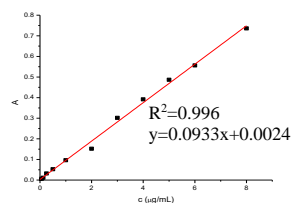
Variable	Factor coordinates of the variables, based on correlations (Spreadsheet1)										
	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Faktor 7	Faktor 8	Faktor 9	Faktor 10	Faktor 11
PGE2	0.414	-0.437	0.045	-0.654	0.348	0.049	0.058	0.268	-0.098	0.000	0.001
TXA2	0.023	0.680	-0.574	-0.354	-0.075	0.228	0.146	-0.050	0.000	0.003	0.034
PGE2-S	-0.728	-0.003	-0.519	-0.255	0.173	-0.177	-0.263	-0.043	-0.006	0.056	-0.003
TXA2-S	-0.404	0.679	0.216	-0.028	0.499	0.238	0.064	-0.130	0.018	-0.010	-0.021
cPLA2á	0.052	0.037	-0.974	0.135	0.011	-0.105	0.074	0.102	0.016	-0.044	-0.023
COX-1	0.511	-0.485	-0.213	0.494	0.385	-0.092	0.209	-0.065	0.092	0.029	0.014
COX-2	-0.361	-0.682	-0.215	0.391	0.112	0.364	-0.233	-0.032	-0.063	-0.027	0.014
mPGES-1	-0.269	0.676	0.108	0.579	0.148	-0.228	-0.006	0.168	-0.145	-0.005	0.015
mPGES-2	-0.923	-0.074	0.201	-0.125	0.082	-0.088	-0.005	0.197	0.182	-0.029	0.016
cPGES	-0.718	-0.485	0.037	-0.265	0.030	-0.235	0.219	-0.249	-0.100	-0.028	0.006
TXAS	-0.832	-0.243	-0.032	0.224	-0.198	0.224	0.283	0.155	-0.036	0.041	-0.013
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Sopstvene vrednosti (Eigenvalues)	3.391	2.573	1.741	1.506	0.636	0.460	0.330	0.262	0.088	0.010	0.003
% Total	30.828	23.387	15.830	13.690	5.780	4.181	3.000	2.379	0.804	0.092	0.029
Cumulative	3.391	5.964	7.705	9.211	9.847	10.306	10.64	10.90	10.99	11.00	11.00
Cumulative	30.83	54.21	70.04	83.73	89.51	93.70	96.70	99.07	99.88	99.97	100.0

9.4. Merlot vina kao modulatori produkcije PGE₂ i TXA₂

9.4.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola, flavonoida, tanina i antocijana

Tabela 9.85. Kalibraciona kriva galne kiseline korišćena za određivanje sadržaja ukupnih polifenola u uzorcima vina Merlot vina M1, M2, M3, M4, M8

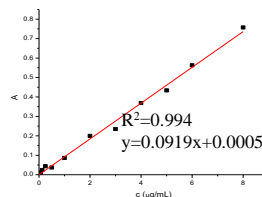
pocetna c μg/ml	radna c μg/ml	A1	A2	A3	A korekcija	A
80.00	8.000	0.794	0.816	0.799	0.055	0.736
60.00	6.000	0.626	0.620	0.620	0.053	0.556
50.00	5.000	0.538	0.565	0.548	0.051	0.487
40.00	4.000	0.450	0.460	0.452	0.050	0.391
30.00	3.000	0.364	0.360	0.369	0.050	0.302
20.00	2.000	0.220	0.217	0.210	0.051	0.152
10.00	1.000	0.159	0.155	0.158	0.048	0.096
5.000	0.500	0.114	0.116	0.117	0.051	0.052
2.500	0.250	0.092	0.097	0.093	0.050	0.032
1.250	0.125	0.073	0.071	0.074	0.049	0.011
0.625	0.063	0.069	0.069	0.069	0.050	0.007
0.000	0.000	0.061	0.065	0.062	0.050	0.000



Grafik 9.43. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja polifenola u uzorcima Merlot vina M1, M2, M3, M4, M8: funkcija zavisnosti apsorbancije od koncentracije galne kiseline

Tabela 9.86. Kalibraciona kriva galne kiseline korišćena za određivanje sadržaja ukupnih polifenola u uzorcima vina Merlot vina M5, M6, M7, M9, M10, M11, M12

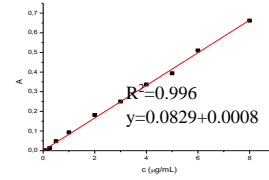
pocetna c μg/ml	radna c μg/ml	A1	A2	A3	A korekcija	A
80.00	8.000	0.817	0.835	0.861	0.057	0.757
60.00	6.000	0.632	0.611	0.687	0.057	0.563
50.00	5.000	0.524	0.498	0.516	0.056	0.434
40.00	4.000	0.449	0.435	0.461	0.056	0.369
30.00	3.000	0.308	0.307	0.319	0.053	0.235
20.00	2.000	0.280	0.275	0.276	0.054	0.200
10.00	1.000	0.167	0.161	0.163	0.054	0.086
5.000	0.500	0.114	0.114	0.111	0.052	0.037
2.500	0.250	0.144	0.125	0.122	0.057	0.043
1.250	0.125	0.106	0.099	0.098	0.054	0.024
0.625	0.063	0.095	0.084	0.086	0.054	0.012
0.000	0.000	0.084	0.077	0.077	0.054	0.000



Grafik 9.44. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja polifenola u uzorcima Merlot vina M5, M6, M7, M9, M10, M11, M12: funkcija zavisnosti apsorbancije od koncentracije galne kiseline

Tabela 9.87. Kalibraciona kriva galne kiseline korišćena za određivanje sadržaja ukupnih polifenola u uzorcima vina Merlot vina MFR, MIT, MMA, MSL, MSP

pocetna c μg/ml	radna c μg/ml	A1	A2	A3	A korekcija	A
80.00	8.000	0.767	0.728	0.743	0.069	0.662
60.00	6.000	0.589	0.576	0.576	0.055	0.510
50.00	5.000	0.490	0.458	0.443	0.055	0.394
40.00	4.000	0.469	0.400	0.411	0.054	0.337
30.00	3.000	0.331	0.305	0.313	0.051	0.250
20.00	2.000	0.256	0.245	0.242	0.051	0.182
10.00	1.000	0.176	0.153	0.151	0.052	0.093
5.000	0.500	0.134	0.121	0.120	0.057	0.048
2.500	0.250	0.076	0.078	0.072	0.049	0.014
1.250	0.125	0.068	0.068	0.067	0.049	0.003
0.625	0.063	0.063	0.066	0.062	0.049	0.000
0.000	0.000	0.063	0.065	0.067	0.050	0.000



Grafik 9.45: Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja polifenola u uzorcima Merlot vina MFR, MIT, MMA, MSL, MSP: funkcija zavisnosti apsorbanije od koncentracije galne kiseline

Tabela 9.88. Sadržaj ukupnih polifenola u uzorcima Merlot vina M1, M2, M3, M4, M5, M6

	Početa koncentracija mg/mL	A1	A2	A3	A korekcija	A	očistana c galne kiseline(µg/ml)	µg ekvivalenata galne	mg suvog ekstrakta	µg ekvivalenata galne kiseline/ mg suvog ekstrakta	µg ekvivalenata galne kiseline/ mL vina		
M1	1.500	0.569	0.571	0.569	0.058	0.488	5.207	1.562	0.045	34.71	35.41	1235	1260
	0.750	0.338	0.333	0.329	0.062	0.248	2.631	0.789	0.023	35.07	±	1248	±
	0.375	0.212	0.214	0.203	0.056	0.130	1.366	0.410	0.011	36.43	0.907	1297	32.26
slepa proba		0.075	0.074	0.073	0.051								
M2	1.500	0.604	0.595	0.598	0.052	0.529	5.641	1.692	0.045	37.61	40.90	1236	1345
	0.750	0.350	0.351	0.362	0.050	0.286	3.045	0.913	0.023	40.60	±	1334	±
	0.375	0.227	0.227	0.227	0.050	0.158	1.669	0.501	0.011	44.51	3.460	1463	113.7
slepa proba		0.070	0.070	0.071	0.052								
M3	1.500	0.645	0.649	0.641	0.052	0.570	6.086	1.826	0.045	40.57	43.68	1334	1436
	0.750	0.392	0.388	0.378	0.052	0.311	3.313	0.994	0.023	44.17	±	1452	±
	0.375	0.238	0.241	0.236	0.051	0.164	1.736	0.521	0.011	46.30	2.895	1522	95.20
slepa proba		0.078	0.072	0.072	0.051								
M4	1.500	0.719	0.735	0.731	0.051	0.658	7.028	2.108	0.045	46.85	49.53	1791	1893
	0.750	0.412	0.419	0.422	0.052	0.346	3.684	1.105	0.023	49.12	±	1877	±
	0.375	0.251	0.258	0.254	0.049	0.187	1.973	0.592	0.011	52.62	2.908	2011	111.1
slepa proba		0.065	0.065	0.068	0.047								
M5	1.500	0.729	0.735	0.721	0.052	0.656	7.130	2.139	0.045	47.53	51.26	1405	1515
	0.750	0.422	0.427	0.414	0.057	0.343	3.723	1.117	0.023	49.64	±	1467	±
	0.375	0.264	0.266	0.276	0.052	0.196	2.123	0.637	0.011	56.60	4.746	1673	140.2
slepa proba		0.070	0.071	0.071	0.050							0	
M6	1.500	0.685	0.687	0.697	0.054	0.608	6.611	1.983	0.045	44.08	47.19	1314	1407
	0.750	0.397	0.401	0.404	0.052	0.320	3.477	1.043	0.023	46.36	±	1382	±
	0.375	0.256	0.259	0.256	0.052	0.177	1.918	0.575	0.011	51.15	3.609	1525	107.6
slepa proba		0.076	0.078	0.079	0.050							0	

Tabela 9.89. Sadržaj ukupnih polifenola u uzorcima Merlot vina M7, M8, M9, M10, M11, M12

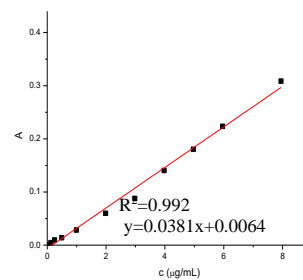
	Početna koncentracija mg/mL	A1	A2	A3	Akorekcija	A	očitanje c galne kiseline(μg/ml)	μg ekvivalenata galne	mg suvog ekstrakta	μg ekvivalenata galne kiseline/ mg suvog ekstrakta	μg ekvivalenata galne kiseline/ mL vina		
M7	1.500	0.735	0.707	0.735	0.055	0.651	7.082	2.125	0.045	47.22	50.47	1458	1558
	0.750	0.403	0.434	0.418	0.052	0.346	3.763	1.129	0.023	50.18	±	1549	±
	0.375	0.256	0.257	0.263	0.052	0.187	2.025	0.608	0.011	54.01	3.405	1667	105.1
slepa proba		0.071	0.073	0.071	0.052							0	
M8	1.500	0.638	0.638	0.632	0.056	0.581	6.205	1.862	0.045	41.37	43.62	1313	1384
	0.750	0.376	0.377	0.375	0.054	0.323	3.441	1.032	0.023	45.88	±	1456	±
	0.375	0.241	0.237	0.236	0.052	0.187	1.976	0.593	0.011	52.70	3.188	1672	101.2
slepa proba		0.075	0.079	0.076	0.079								
M9	1.500	0.430	0.426	0.439	0.056	0.358	3.891	1.167	0.045	25.94	28.13	719.5	780.2
	0.750	0.266	0.263	0.267	0.054	0.194	2.110	0.633	0.023	28.13	±	780.4	±
	0.375	0.174	0.173	0.179	0.054	0.105	1.137	0.341	0.011	30.31	2.186	840.8	60.63
slepa proba		0.072	0.072	0.076	0.056							0	
M10	1.500	0.670	0.640	0.668	0.053	0.580	6.301	1.890	0.045	42.01	45.57	1559	1691
	0.750	0.388	0.384	0.403	0.051	0.314	3.406	1.022	0.023	45.41	±	1685	±
	0.375	0.248	0.246	0.250	0.051	0.170	1.848	0.554	0.011	49.29	3.642	1829	135.2
slepa proba		0.080	0.080	0.077	0.052							0	
M11	1.500	0.557	0.555	0.562	0.052	0.476	5.177	1.553	0.045	34.51	37.53	1088	1182
	0.750	0.341	0.328	0.334	0.053	0.251	2.728	0.818	0.023	36.38	±	1146	±
	0.375	0.227	0.230	0.224	0.053	0.144	1.563	0.469	0.011	41.69	3.726	1314	117.4
slepa proba		0.084	0.081	0.082	0.052							0	
M12	1.500	0.582	0.573	0.589	0.051	0.502	5.460	1.638	0.045	36.40	39.85	1497	1639
	0.750	0.360	0.357	0.354	0.054	0.276	2.996	0.899	0.023	39.94	±	1642	±
	0.375	0.230	0.226	0.231	0.052	0.149	1.620	0.486	0.011	43.21	3.403	1777	139.9
slepa proba		0.081	0.078	0.079	0.052							0	

Tabela 9.90. Sadržaj ukupnih polifenola u uzorcima Merlot vina MFR, MIT, MMA, MSL, MSP

	Početna koncentracija mg/mL	A1	A2	A3	A korekcija	A	očitanje c galne kiseline(µg/ml)	µg ekvivalenta galne	mg suvog ekstrakta	µg ekvivalenta galne kiseline/ mg suvog ekstrakta		µg ekvivalenta galne kiseline/ mL vina	
MFR	1.500	0.668	0.658	0.685	0.052	0.602	7.247	2.174	0.045	48.32	51.50	1880	2004
	0.750	0.395	0.405	0.404	0.050	0.334	4.024	1.207	0.023	53.66	±	2088	±
	0.375	0.243	0.243	0.248	0.063	0.164	1.970	0.591	0.011	52.52	2.815	2044	109.5
slepa proba		0.066	0.067	0.065	0.049		-0.010						
MIT	1.500	0.576	0.606	0.599	0.053	0.498	5.995	1.798	0.045	39.96	40.49	1165	1180
	0.750	0.360	0.384	0.363	0.054	0.256	3.077	0.923	0.023	41.02	±	1195	±
	0.375	0.285	0.260	0.267	0.053	0.159	1.912	0.574	0.011	50.99	0.748	1486	21.81
slepa proba		0.109	0.106	0.100	0.054								
MMA	1.500	0.741	0.734	0.764	0.052	0.679	8.176	2.453	0.045	54.51	57.93	1903	2022
	0.750	0.434	0.428	0.439	0.053	0.360	4.327	1.298	0.023	57.70	±	2014	±
	0.375	0.264	0.262	0.263	0.049	0.192	2.309	0.693	0.011	61.58	3.542	2150	123.6
slepa proba		0.071	0.069	0.074	0.050								
MSL	1.500	0.771	0.752	0.743	0.053	0.667	8.037	2.411	0.045	53.58	60.29	1575	1772
	0.750	0.483	0.476	0.436	0.054	0.391	4.704	1.411	0.023	62.72	±	1843	±
	0.375	0.299	0.292	0.273	0.052	0.202	2.421	0.726	0.011	64.57	5.886	1898	173.0
slepa proba		0.095	0.097	0.083	0.057								
MSP	1.500	0.629	0.616	0.628	0.053	0.565	6.803	2.041	0.045	45.36	48.28	1747	1859
	0.750	0.356	0.354	0.358	0.050	0.296	3.554	1.066	0.023	47.39	±	1825	±
	0.375	0.225	0.224	0.222	0.050	0.163	1.954	0.586	0.011	52.10	3.457	2006	133.1
slepa proba		0.060	0.066	0.060	0.052								

Tabela 9.91. Kalibraciona kriva kvercetina za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida u uzorcima Merlot vina M1-M12

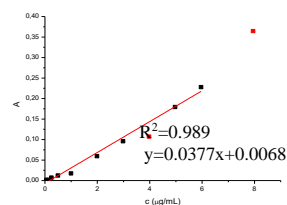
pocetna c μg/ml	radna c μg/ml	A1	A2	A3	A korekcija	A
80.00	7.947	0.534	0.537	0.526	0.225	0.309
60.00	5.960	0.416	0.408	0.418	0.191	0.224
50.00	4.967	0.353	0.367	0.354	0.179	0.180
40.00	3.974	0.303	0.297	0.300	0.161	0.140
30.00	2.980	0.223	0.231	0.222	0.139	0.088
20.00	1.987	0.176	0.180	0.177	0.119	0.060
10.00	0.993	0.113	0.115	0.113	0.086	0.028
5.000	0.497	0.083	0.083	0.083	0.070	0.014
2.500	0.248	0.068	0.071	0.069	0.060	0.010
1.250	0.124	0.058	0.060	0.059	0.055	0.004
0.625	0.062	0.053	0.055	0.054	0.054	0.001
0.000	0.000	0.050	0.050	0.050	0.051	0.000



Grafik 9.46. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida u uzorcima vina M1, -- M12: funkcija zavisnosti apsorbancije od koncentracije kvercetina

Tabela 9.92. Kalibraciona kriva kvercetina za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida u uzorcima Merlot vina MFR, MIT, MMA, MSL, MSP

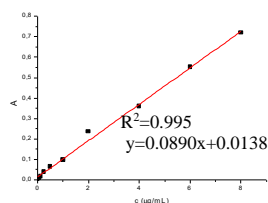
pocetna c μg/ml	radna c μg/ml	A1	A2	A3	A korekcija	A
80.00	7.947	0.612	0.612	0.615	0.249	0.365
60.00	5.960	0.447	0.446	0.448	0.220	0.228
50.00	4.967	0.371	0.367	0.376	0.193	0.179
40.00	3.974	0.286	0.280	0.291	0.182	0.107
30.00	2.980	0.240	0.237	0.234	0.142	0.096
20.00	1.987	0.181	0.179	0.179	0.121	0.059
10.00	0.993	0.123	0.118	0.122	0.106	0.017
5.000	0.497	0.097	0.089	0.087	0.080	0.012
2.500	0.248	0.068	0.073	0.067	0.063	0.007
1.250	0.124	0.058	0.057	0.059	0.057	0.002
0.625	0.062	0.056	0.055	0.057	0.055	0.002
0.000	0.000	0.051	0.052	0.053	0.053	0.000



Grafik 9.47 Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida u uzorcima vina MFR, MIT, MMA, MSL, MSP funkcija zavisnosti apsorbancije od koncentracije kvercetina

Tabela 9.93. Kalibraciona kriva katehina za određivanje sadržaja ukupnih tanina u uzorcima Merlot vina M1-M12, MFR, MIT, MMA, MSL, MSP

pocetna c μg/ml	radna c μg/ml	A1	A2	A3	A korekcija	A
80.00	8.000	0.845	0.713	0.781	0.049	0.718
60.00	6.000	0.685	0.531	0.628	0.051	0.593
40.00	4.000	0.425	0.424	0.413	0.048	0.360
20.00	2.000	0.296	0.304	0.290	0.049	0.235
10.00	1.000	0.162	0.167	0.145	0.048	0.098
5.000	0.500	0.128	0.128	0.120	0.048	0.065
2.500	0.250	0.106	0.101	0.091	0.048	0.039
1.250	0.125	0.085	0.075	0.078	0.050	0.017
0.625	0.063	0.069	0.072	0.067	0.049	0.008
0.000	0.000	0.058	0.069	0.062	0.051	0.000



Grafik 9.48: Kalibraciona kriva za određivanje sadržaja tanina u uzorcima Merlot vina: funkcija zavisnosti apsorbancije od koncentracije katehina

Tabela 9.94. Sadržaj ukupnih flavonoida u uzorcima Merlot vina M1-M6

	Početna c ekstrakta mg/mL	A1	A2	A3	A korekcija	A	očitanje c kvercetina ($\mu\text{g/ml}$)	μg ekvivalenata kvercetina	mg suvog ekstrakta	μg ekvivalenata kvercetina/mg suvog ekstrakta		μg ekvivalenata kvercetina/ mL vina	
M1	30.00	0.341	0.351	0.365	0.235	0.117	3.239	0.972	0.900	1.080	1.066	38.43	37.95
	15.00	0.199	0.207	0.205	0.150	0.053	1.567	0.470	0.450	1.045	±	37.18	±
	3.750	0.088	0.090	0.090	0.080	0.009	0.403	0.121	0.113	1.074	0.019	38.24	0.671
slepa proba		0.052	0.053	0.052	0.052								
M2	30.00	0.332	0.299	0.259	0.188	0.089	2.516	0.755	0.900	0.839	0.622	27.56	20.44
	15.00	0.152	0.156	0.155	0.125	0.028	0.899	0.270	0.450	0.599	±	19.70	±
	7.500	0.104	0.114	0.108	0.096	0.012	0.483	0.145	0.225	0.645	0.032	21.19	1.048
slepa proba		0.055	0.053	0.053	0.052								
M3	30.00	0.418	0.401	0.379	0.234	0.165	4.493	1.348	0.900	1.498	1.519	49.24	49.95
	7.500	0.144	0.147	0.144	0.107	0.038	1.166	0.350	0.225	1.554	±	51.10	±
	3.750	0.097	0.096	0.096	0.081	0.015	0.565	0.169	0.113	1.506	0.031	49.52	1.004
slepa proba		0.052	0.053	0.052	0.052								
M4	15.00	0.235	0.264	0.234	0.173	0.070	2.018	0.605	0.450	1.346	1.430	51.42	54.64
	7.500	0.150	0.167	0.143	0.118	0.036	1.100	0.330	0.225	1.466	±	56.04	±
	3.750	0.100	0.102	0.102	0.086	0.015	0.554	0.166	0.113	1.477	0.073	56.46	2.793
slepa proba		0.052	0.052	0.052	0.052								
M5	30.00	0.301	0.298	0.288	0.217	0.080	2.279	0.684	0.900	0.760	0.738	22.44	21.80
	15.00	0.170	0.178	0.163	0.144	0.032	1.006	0.302	0.450	0.671	±	19.81	±
	7.50	0.119	0.116	0.114	0.102	0.016	0.588	0.176	0.225	0.784	0.060	23.16	1.762
slepa proba		0.052	0.052	0.052	0.053								
M6	30.00	0.370	0.376	0.345	0.245	0.117	3.243	0.973	0.900	1.081	1.049	32.24	31.28
	15.00	0.201	0.207	0.201	0.154	0.048	1.421	0.426	0.450	0.947	±	28.25	±
	7.500	0.138	0.138	0.133	0.110	0.026	0.839	0.252	0.225	1.118	0.090	33.35	2.680
slepa proba		0.055	0.053	0.053	0.052								

Tabela 9.95. Sadržaj ukupnih flavonoida u uzorcima Merlot vina M7-M12

	Počtna c ekstrakta mg/mL	A1	A2	A3	Akorekcija	A	očtna c kvercetina (µg/ml)	µg ekvivalenata kvercetina	mg suvog ekstrakta	µg ekvivalenata kvercetina/mg suvog ekstrakta	µg ekvivalenata kvercetina/ mL vina		
M7	15.00	0.172	0.176	0.167	0.132	0.043	1.295	0.388	0.450	0.863	0.966	26.65	29.85
	7.500	0.112	0.117	0.117	0.095	0.022	0.735	0.221	0.225	0.980	±	30.26	±
	3.750	0.081	0.084	0.089	0.076	0.009	0.396	0.119	0.113	1.055	0.097	32.58	2.991
slepa proba		0.054	0.052	0.053	0.053								
M8	15.00	0.159	0.163	0.161	0.125	0.035	1.092	0.327	0.450	0.728	0.803	23.09	25.49
	7.500	0.113	0.116	0.112	0.094	0.019	0.658	0.198	0.225	0.878	±	27.85	±
	3.750	0.082	0.082	0.083	0.076	0.005	0.302	0.091	0.113	0.805	0.075	25.53	2.381
slepa proba		0.055	0.053	0.053	0.052								
M9	30.00	0.234	0.243	0.241	0.163	0.074	2.117	0.635	0.900	0.706	0.847	19.58	23.50
	15.00	0.149	0.158	0.152	0.109	0.042	1.266	0.380	0.450	0.844	±	23.41	±
	3.750	0.077	0.075	0.078	0.069	0.006	0.319	0.096	0.113	0.851	0.005	23.60	0.135
slepa proba		0.055	0.052	0.056	0.053								
M10	15.00	0.153	0.144	0.143	0.124	0.018	0.638	0.191	0.450	0.425	0.433	15.78	16.07
	7.500	0.099	0.103	0.104	0.094	0.006	0.337	0.101	0.225	0.449	±	16.67	±
	3.750	0.076	0.081	0.084	0.079	0.000	0.159	0.048	0.113	0.425	0.014	15.78	0.514
slepa proba		0.055	0.052	0.056	0.053								
M11	30.00	0.229	0.231	0.225	0.177	0.052	1.543	0.463	0.900	0.514	0.554	16.21	17.46
	15.00	0.143	0.143	0.142	0.114	0.028	0.891	0.267	0.450	0.594	±	18.71	±
	7.500	0.099	0.101	0.104	0.094	0.006	0.334	0.100	0.225	0.445	0.056	14.02	1.769
sp		0.055	0.052	0.055	0.053								
M12	30.00	0.236	0.246	0.238	0.189	0.050	1.492	0.448	0.900	0.497	0.499	20.45	20.52
	15.00	0.145	0.150	0.152	0.126	0.022	0.751	0.225	0.450	0.501	±	20.59	±
	7.500	0.102	0.101	0.103	0.089	0.011	0.461	0.138	0.225	0.614	0.002	25.25	0.102
slepa proba		0.055	0.052	0.055	0.053								

Tabela 9.96. Sadržaj ukupnih flavonoida u uzorcima Merlot vina MFR, MIT, MMA, MSL, MSP

	Početna c ekstrakta mg/mL	A1	A2	A3	A korekcija	A	očitanja c kvercetina ($\mu\text{g/ml}$)	μg ekvivalenata kvercetina	mg suvog ekstrakta	μg ekvivalenata kvercetina/mg suvog ekstrakta	μg ekvivalenata kvercetina/mL vina		
MFR	30.00	0.421	0.418	0.421	0.240	0.182	4.997	1.499	0.900	1.666	1.730	64.83	67.33
	15.00	0.249	0.245	0.245	0.152	0.095	2.691	0.807	0.450	1.794	±	69.83	±
	7.500	0.161	0.159	0.158	0.109	0.051	1.523	0.457	0.225	2.030	0.091	79.02	3.541
slepa proba		0.055	0.056	0.061	0.058								
MIT	30.00	0.351	0.345	0.346	0.221	0.126	3.535	1.061	0.900	1.178	1.253	34.34	36.52
	15.00	0.205	0.204	0.203	0.142	0.062	1.835	0.551	0.450	1.223	±	35.65	±
	7.500	0.131	0.133	0.137	0.101	0.032	1.019	0.306	0.225	1.358	0.093	39.57	2.724
slepa proba		0.056	0.055	0.053	0.055								
MMA	30.00	0.510	0.497	0.483	0.311	0.186	5.120	1.536	0.900	1.707	1.705	59.58	59.52
	15.00	0.286	0.278	0.273	0.189	0.094	2.681	0.804	0.450	1.788	±	62.41	±
	7.500	0.169	0.171	0.170	0.132	0.039	1.215	0.365	0.225	1.620	0.084	56.56	2.923
slepa proba		0.055	0.056	0.054	0.056								
MSL	30.00	0.449	0.489	0.447	0.251	0.198	5.432	1.630	0.900	1.811	1.943	53.21	57.12
	15.00	0.257	0.264	0.258	0.157	0.104	2.936	0.881	0.450	1.957	±	57.53	±
	7.500	0.165	0.163	0.162	0.112	0.052	1.547	0.464	0.225	2.063	0.127	60.62	3.719
slepa proba		0.052	0.056	0.055	0.055								
MSP	30.00	0.432	0.434	0.451	0.243	0.194	5.316	1.595	0.900	1.772	1.790	68.24	68.94
	15.00	0.254	0.266	0.255	0.153	0.103	2.904	0.871	0.450	1.936	±	74.56	±
	7.500	0.155	0.162	0.157	0.116	0.040	1.247	0.374	0.225	1.663	0.138	64.02	5.303
slepa proba		0.058	0.055	0.057	0.054								

Tabela 9.97. Sadržaj ukupnih tanina u uzorcima Merlot vina M1, M2, M3

	Početna c ekstrakta mg/mL	A1	A2	A3	A korekcija		očitanja c katehina (µg/ml)	µg ekvivalenata katehina	mg suvog ekstrakta	µg ekvivalenata katehina/ mg suvog	Sadržaj ukupnih tanina			
					A						µg ekvivalenata katehina/ mg suvog ekstrakta	µg ekvivalenata katehina / mL vina		
M1	1.500	0.569	0.571	0.569	0.058	0.488	5.326	1.598	0.045	35.51	14.36	14.10 ± 0.372	511.0	501.7 ± 13.22
	0.750	0.338	0.333	0.329	0.062	0.248	2.627	0.788	0.023	35.03	13.83		492.3	
	0.375	0.212	0.214	0.203	0.056	0.130	1.303	0.391	0.011	34.74	11.11		395.5	
slepa proba		0.075	0.074	0.073	0.051									
M1 istaloženi tanini	1.500	0.381	0.389	0.394	0.070	0.296	3.172	0.952	0.045	21.15				
	0.750	0.237	0.235	0.242	0.061	0.155	1.590	0.477	0.023	21.20				
	0.375	0.173	0.169	0.178	0.059	0.093	0.886	0.266	0.011	23.63				
slepa proba		0.074	0.073	0.073	0.051									
M2	1.500	0.611	0.634	0.613	0.055	0.499	5.445	1.634	0.045	36.30	11.11	10.68 ± 0.603	365.1	351.1 ± 19.81
	0.750	0.384	0.377	0.369	0.051	0.260	2.762	0.829	0.023	36.83	10.26		337.1	
	0.375	0.246	0.257	0.259	0.052	0.136	1.374	0.412	0.011	36.65	4.25		139.6	
slepa proba		0.132	0.126	0.115	0.055									
M2 istaloženi tanini	1.500	0.454	0.453	0.453	0.082	0.350	3.779	1.134	0.045	25.19				
	0.750	0.277	0.277	0.278	0.064	0.191	1.993	0.598	0.023	26.57				
	0.375	0.223	0.201	0.197	0.064	0.122	1.215	0.365	0.011	32.40				
slepa proba		0.071	0.076	0.075	0.053									
M3	1.500	0.645	0.649	0.641	0.052	0.570	6.247	1.874	0.045	41.65	10.68	10.87 ± 0.343	351.2	357.4 ± 11.27
	0.750	0.392	0.388	0.378	0.052	0.311	3.342	1.003	0.023	44.56	11.27		370.5	
	0.375	0.238	0.241	0.236	0.051	0.164	1.691	0.507	0.011	45.08	10.66		350.6	
slepa proba		0.078	0.072	0.072	0.051									
M3 istaloženi tanini	1.500	0.512	0.506	0.505	0.056	0.427	4.644	1.393	0.045	30.96				
	0.750	0.313	0.314	0.320	0.056	0.236	2.497	0.749	0.023	33.29				
	0.375	0.234	0.212	0.215	0.061	0.129	1.291	0.387	0.011	34.42				
slepa proba		0.066	0.068	0.087	0.050									

Tabela 9.98. Sadržaj ukupnih tanina u uzorcima Merlot vina M4, M5, M6

	Početna c ekstrakta mg/mL	A korekcija					očitana c katehina (µg/ml)	µg ekvivalenata katehina	mg suvog ekstrakta	µg ekvivalenata katehina/ mg suvog ekstrakta	Sadržaj ukupnih tanina				
		A1	A2	A3	A	A					µg ekvivalenata katehina / mg suvog ekstrakta	±	µg ekvivalenata katehina / mL vina	±	
M4	1.500	0.719	0.735	0.731	0.051	0.658	7.234	2.170	0.045	48.22	25.41	24.80	971.3	947.8	
	0.750	0.412	0.419	0.422	0.052	0.346	3.731	1.119	0.023	49.74	25.41		±		971.0
	0.375	0.251	0.258	0.254	0.049	0.187	1.939	0.582	0.011	51.70	23.58		±		901.2
slepa proba		0.065	0.065	0.068	0.047							1.057		40.40	
M4 istaloženi tanini	1.500	0.417	0.406	0.414	0.076	0.319	3.421	1.026	0.045	22.81					
	0.750	0.261	0.275	0.262	0.072	0.176	1.825	0.548	0.023	24.34					
	0.375	0.205	0.191	0.200	0.071	0.108	1.055	0.316	0.011	28.13					
slepa proba		0.065	0.066	0.067	0.049										
M5	1.500	0.729	0.735	0.721	0.052	0.656	7.207	2.162	0.045	48.05	9.47	8.787	279.8	259.6	
	0.750	0.422	0.427	0.414	0.057	0.343	3.692	1.108	0.023	49.22	8.51		±		251.5
	0.375	0.264	0.266	0.276	0.052	0.196	2.040	0.612	0.011	54.41	8.38		±		247.7
slepa proba		0.070	0.071	0.071	0.050							0.594		17.56	
M5 istaloženi tanini	1.500	0.609	0.604	0.598	0.056	0.529	5.787	1.736	0.045	38.58					
	0.750	0.363	0.355	0.362	0.056	0.286	3.053	0.916	0.023	40.71					
	0.375	0.261	0.256	0.250	0.067	0.168	1.726	0.518	0.011	46.03					
slepa proba		0.067	0.071	0.068	0.050										
M6	1.500	0.685	0.687	0.697	0.054	0.608	6.672	2.002	0.045	44.48	17.13	16.12	510.7	480.8	
	0.750	0.397	0.401	0.404	0.052	0.320	3.438	1.031	0.023	45.83	15.14		±		451.5
	0.375	0.256	0.259	0.256	0.052	0.177	1.829	0.549	0.011	48.78	16.10		±		480.2
slepa proba		0.076	0.078	0.079	0.050							0.993		29.60	
M6 istaloženi tanini	1.500	0.449	0.440	0.450	0.057	0.379	4.103	1.231	0.045	27.35					
	0.750	0.296	0.283	0.288	0.060	0.219	2.302	0.691	0.023	30.69					
	0.375	0.210	0.207	0.211	0.077	0.123	1.226	0.368	0.011	32.68					
slepa proba		0.066	0.066	0.067	0.057										

Tabela 9.99. Sadržaj ukupnih tanina u uzorcima Merlot vina M7, M8, M9

	Početna c ekstrakta mg/mL	A1	A2	A3	A korekcije	A	očitanja c katehina (µg/ml)	µg ekvivalenata katehina	mg suvog ekstrakta	µg ekvivalenata katehina / mg suvog ekstrakta	Sadržaj ukupnih tanina			
											µg ekvivalenata katehina / mg ekstrakta	±	µg ekvivalenata katehina / mL vina	±
M7	1.50	0.673	0.664	0.672	0.054	0.592	6.492	1.947	0.045	43.28	17.99	19.69 ± 1.510	555.3	607.8
	0.75	0.400	0.411	0.406	0.058	0.324	3.483	1.045	0.023	46.44	20.21		623.8	±
	0.38	0.253	0.267	0.253	0.054	0.180	1.867	0.560	0.011	49.80	20.87		644.4	46.61
slepa proba		0.080	0.080	0.079	0.056									
M7 istaloženi tanini	1.50	0.428	0.431	0.440	0.068	0.352	3.793	1.138	0.045	25.29				
	0.75	0.265	0.267	0.264	0.063	0.189	1.968	0.590	0.023	26.23				
	0.38	0.192	0.181	0.193	0.065	0.110	1.085	0.325	0.011	28.93				
slepa proba		0.063	0.064	0.073	0.054									
M8	1.500	0.638	0.638	0.632	0.056	0.581	6.372	1.912	0.045	42.48	24.94	25.98 ± 1.470	791.4	824.4
	0.750	0.376	0.377	0.375	0.054	0.323	3.476	1.043	0.023	46.35	27.02		857.4	±
	0.375	0.241	0.237	0.236	0.052	0.187	1.942	0.583	0.011	51.78	32.10		1018	46.65
slepa proba		0.075	0.079	0.076	0.079									
M8 istaloženi tanini	1.500	0.338	0.334	0.340	0.070	0.248	2.630	0.789	0.045	17.54				
	0.750	0.235	0.239	0.235	0.074	0.143	1.449	0.435	0.023	19.33				
	0.375	0.168	0.165	0.173	0.070	0.080	0.738	0.221	0.011	19.69				
slepa proba		0.071	0.073	0.069	0.052									
M9	1.500	0.430	0.426	0.439	0.056	0.358	3.865	1.159	0.045	25.76	10.82	10.98 ± 0.219	300.2	304.5
	0.750	0.266	0.263	0.267	0.054	0.194	2.027	0.608	0.023	27.03	11.13		308.8	±
	0.375	0.174	0.173	0.179	0.054	0.105	1.023	0.307	0.011	27.28	6.870		190.5	6.075
slepa proba		0.072	0.072	0.076	0.056									
M9 istaloženi tanini	1.500	0.286	0.285	0.288	0.057	0.213	2.241	0.672	0.045	14.94				
	0.750	0.195	0.190	0.193	0.057	0.120	1.192	0.358	0.023	15.90				
	0.375	0.156	0.155	0.152	0.056	0.082	0.766	0.230	0.011	20.42				
slepa proba		0.064	0.068	0.067	0.050									

Tabela 9.100. Sadržaj ukupnih tanina u uzorcima Merlot vina M10, M11, M12

	Početna c ekstrakta mg/mL	A1	A2	A3	A korekcija	A	očitanje c katehina (µg/mL)	µg ekvivalenata katehina	mg suvog ekstrakta	µg ekvivalenata katehina / mg suvog ekstrakta	Sadržaj ukupnih tanina			
											µg ekvivalenata katehina / mg suvog ekstrakta	±	µg ekvivalenata katehina / mL vina	±
M10	1.500	0.670	0.640	0.668	0.053	0.580	6.352	1.906	0.045	42.35	15.03	15.47 ± 0.624	557.6	574.0 ± 23.16
	0.750	0.388	0.384	0.403	0.051	0.314	3.365	1.009	0.023	44.86	15.91		590.4	
	0.375	0.248	0.246	0.250	0.051	0.170	1.757	0.527	0.011	46.87	13.22		490.8	
slepa proba		0.080	0.080	0.077	0.052									
M10 istaloženi tanini	1.500	0.456	0.455	0.457	0.057	0.379	4.098	1.229	0.045	27.32				
	0.750	0.286	0.281	0.282	0.056	0.207	2.172	0.651	0.023	28.95				
	0.375	0.206	0.197	0.203	0.056	0.126	1.262	0.378	0.011	33.64				
slepa proba		0.074	0.067	0.069	0.050									
M11	1.500	0.557	0.555	0.562	0.052	0.476	5.192	1.558	0.045	34.61	14.86	15.73	468.3	495.6
	0.750	0.341	0.328	0.334	0.053	0.251	2.665	0.800	0.023	35.54	15.58	±	490.9	±
	0.375	0.227	0.230	0.224	0.053	0.144	1.464	0.439	0.011	39.03	16.75	0.951	527.7	29.97
slepa proba		0.084	0.081	0.082	0.052									
M11 istaloženi tanini	1.500	0.353	0.357	0.366	0.056	0.278	2.963	0.889	0.045	19.75				
	0.750	0.233	0.230	0.225	0.057	0.147	1.497	0.449	0.023	19.96				
	0.375	0.171	0.169	0.169	0.056	0.088	0.836	0.251	0.011	22.28				
slepa proba		0.086	0.072	0.072	0.052									
M12	1.500	0.523	0.531	0.528	0.052	0.442	4.810	1.443	0.045	32.07	13.08	12.46	537.8	512.4
	0.750	0.313	0.307	0.303	0.052	0.223	2.346	0.704	0.023	31.27	11.84	±	486.9	±
	0.375	0.210	0.213	0.238	0.054	0.133	1.343	0.403	0.011	35.80	6.700	0.876	275.5	36.01
slepa proba		0.076	0.090	0.100	0.055									
M12 istaloženi tanini	1.500	0.369	0.368	0.372	0.060	0.267	2.848	0.854	0.045	18.99				
	0.750	0.242	0.246	0.265	0.065	0.144	1.457	0.437	0.023	19.43				
	0.375	0.202	0.218	0.209	0.060	0.111	1.091	0.327	0.011	29.10				
slepa proba		0.088	0.094	0.103	0.053									

Tabela 9.101. Sadržaj ukupnih tanina u uzorcima Merlot vina MFR, MIT, MSL

	Početna c ekstrakta mg/mL	A1	A2	A3	A korekcija	A	očitanja c katehina ($\mu\text{g/mL}$)	μg ekvivalenata katehina	mg suvog ekstrakta	μg ekvivalenata katehina / mg suvog ekstrakta	Sadržaj ukupnih tanina			
											μg ekvivalenata katehina / mg suvog ekstrakta	μg ekvivalenata katehina / mL vina		
MFR	1.500	0.668	0.658	0.685	0.052	0.602	6.601	1.980	0.045	44.00	26.18	27.36	1018	1065
	0.750	0.395	0.405	0.404	0.050	0.334	3.600	1.080	0.023	48.00	28.54	±	1111	±
	0.375	0.243	0.243	0.248	0.063	0.164	1.687	0.506	0.011	44.99	22.57	1.669	878.5	64.97
slepa proba		0.066	0.067	0.065	0.049									
MFR istaloženi tanini	1.500	0.322	0.320	0.323	0.059	0.252	2.674	0.802	0.045	17.83				
	0.750	0.209	0.218	0.210	0.059	0.144	1.460	0.438	0.023	19.47				
	0.375	0.156	0.160	0.157	0.058	0.089	0.841	0.252	0.011	22.42				
slepa proba		0.060	0.063	0.065	0.052									
MIT	1.500	0.576	0.606	0.599	0.053	0.500	5.459	1.638	0.045	36.39	14.96	19.33	436.0	563.2
	0.750	0.360	0.384	0.363	0.054	0.266	2.826	0.848	0.023	37.68	19.35	±	563.8	±
	0.375	0.285	0.260	0.267	0.053	0.162	1.658	0.498	0.011	44.23	19.30	0.032	562.5	0.940
slepa proba		0.109	0.106	0.100	0.054									
MIT istaloženi tanini	1.500	0.371	0.376	0.387	0.064	0.300	3.215	0.964	0.045	21.43				
	0.750	0.215	0.212	0.217	0.064	0.136	1.375	0.413	0.023	18.33				
	0.375	0.159	0.159	0.207	0.063	0.097	0.935	0.280	0.011	24.92				
slepa proba		0.066	0.060	0.074	0.053									
MMA	1.500	0.741	0.734	0.764	0.052	0.673	7.397	2.219	0.045	49.31	23.16	22.41	808.5	782.3
	0.750	0.434	0.428	0.439	0.053	0.360	3.882	1.165	0.023	51.76	22.45	±	783.7	±
	0.375	0.264	0.262	0.263	0.049	0.192	2.003	0.601	0.011	53.42	21.62	0.772	754.6	26.97
slepa proba		0.071	0.069	0.074	0.050									
MMA istaloženi tanini	1.500	0.448	0.446	0.446	0.068	0.363	3.923	1.177	0.045	26.15				
	0.750	0.297	0.292	0.288	0.067	0.210	2.198	0.659	0.023	29.31				
	0.375	0.187	0.200	0.189	0.059	0.120	1.193	0.358	0.011	31.81				
sp		0.067	0.063	0.066	0.050									

Tabela 9.102. Sadržaj ukupnih tanina u uzorcima Merlot vina MSL, MSP

	Početna koncentracija ekstrakta mg/mL	A1	A2	A3	Akorekcija	A	očitanje katehina (µg/ml)	µg ekvivalenata katehina	mg suvog ekstrakta	µg ekvivalenata katehina / mg suvog ekstrakta	Sadržaj ukupnih tanina			
											µg ekvivalenata katehina / mg suvog ekstrakta	µg ekvivalenata katehina / mL vina		
MSL	1.500	0.771	0.752	0.743	0.053	0.667	7.335	2.201	0.045	48.90	31.57	42.57	927.76	1251
	0.750	0.483	0.476	0.436	0.054	0.376	4.070	1.221	0.023	54.27	39.66	±	1165.52	±
	0.375	0.299	0.292	0.273	0.052	0.202	2.108	0.632	0.011	56.21	45.49	4.122	1336.84	121.1
slepa proba		0.095	0.097	0.083	0.057									
MSL istaloženi tanini	1.500	0.374	0.367	0.347	0.063	0.245	2.600	0.780	0.045	17.34				
	0.750	0.226	0.219	0.222	0.056	0.111	1.096	0.329	0.023	14.62				
	0.375	0.188	0.184	0.186	0.081	0.050	0.402	0.121	0.011	10.72				
slepa proba		0.063	0.060	0.192	0.051									
MSP	1.500	0.629	0.616	0.628	0.053	0.565	6.187	1.856	0.045	41.25	24.25	24.56	934.03	946.0
	0.750	0.356	0.354	0.358	0.050	0.296	3.163	0.949	0.023	42.17	24.00	±	924.08	±
	0.375	0.225	0.224	0.222	0.050	0.163	1.672	0.502	0.011	44.60	25.44	0.773	979.88	29.76
slepa proba		0.060	0.066	0.060	0.052									
MSP istaloženi tanini	1.500	0.325	0.301	0.315	0.062	0.241	2.549	0.765	0.045	17.00				
	0.750	0.212	0.198	0.206	0.060	0.135	1.363	0.409	0.023	18.17				
	0.375	0.156	0.150	0.150	0.063	0.078	0.718	0.215	0.011	19.15				
slepa proba		0.060	0.066	0.060	0.052									

Tabela 9.103. Sadržaj ukupnih antocijana u Merlot vinima-

	pH1						pH4									A _{pH1} -A _{pH4}					
	520nm			700nm			A ₅₂₀ -A ₇₀₀			520nm			700nm			A ₅₂₀ -A ₇₀₀			A1	A2	A3
	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1 ₅₂₀	A2 ₅₂₀	A3 ₅₂₀	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1 ₅₂₀	A2 ₅₂₀	A3 ₅₂₀			
M1	0.588	0.595	0.589	0.055	0.055	0.057	0.533	0.540	0.532	0.370	0.374	0.368	0.063	0.063	0.062	0.307	0.311	0.306	0.225	0.228	0.226
M2	0.497	0.510	0.514	0.052	0.051	0.052	0.446	0.459	0.462	0.314	0.315	0.298	0.060	0.060	0.059	0.254	0.254	0.239	0.191	0.205	0.223
M3	1.239	1.256	1.249	0.060	0.058	0.060	1.179	1.198	1.188	0.430	0.437	0.416	0.064	0.075	0.064	0.365	0.363	0.352	0.814	0.835	0.836
M4	0.589	0.593	0.597	0.071	0.058	0.063	0.519	0.535	0.535	0.442	0.456	0.445	0.063	0.069	0.072	0.378	0.387	0.373	0.141	0.149	0.162
M5	0.713	0.705	0.737	0.054	0.055	0.055	0.659	0.650	0.682	0.307	0.316	0.310	0.062	0.061	0.062	0.245	0.255	0.248	0.414	0.395	0.434
M6	0.762	0.766	0.776	0.068	0.060	0.067	0.693	0.706	0.709	0.448	0.440	0.447	0.066	0.068	0.068	0.381	0.372	0.378	0.312	0.334	0.331
M7	0.454	0.458	0.445	0.055	0.056	0.056	0.399	0.402	0.389	0.312	0.320	0.317	0.066	0.067	0.067	0.247	0.253	0.250	0.152	0.149	0.139
M8	0.701	0.709	0.720	0.057	0.055	0.053	0.644	0.654	0.667	0.283	0.288	0.272	0.059	0.058	0.060	0.224	0.230	0.212	0.420	0.424	0.455
M9	0.413	0.418	0.418	0.058	0.058	0.059	0.355	0.360	0.360	0.265	0.265	0.271	0.058	0.057	0.058	0.207	0.208	0.214	0.147	0.152	0.146
M10	0.489	0.501	0.501	0.056	0.054	0.054	0.433	0.447	0.447	0.298	0.301	0.299	0.051	0.050	0.051	0.247	0.251	0.248	0.187	0.196	0.199
M11	0.829	0.813	0.795	0.054	0.053	0.054	0.775	0.761	0.741	0.309	0.322	0.315	0.053	0.056	0.055	0.256	0.266	0.259	0.520	0.494	0.482
M12	0.321	0.317	0.312	0.055	0.056	0.056	0.266	0.261	0.256	0.259	0.259	0.252	0.063	0.061	0.061	0.196	0.197	0.191	0.070	0.064	0.065
MFR	2.394	2.328	2.555	0.063	0.061	0.064	2.331	2.268	2.491	0.927	0.934	0.894	0.063	0.069	0.066	0.863	0.864	0.828	1.468	1.404	1.663
MIT	1.580	1.483	1.530	0.059	0.060	0.062	1.520	1.423	1.468	0.769	0.763	0.768	0.065	0.062	0.060	0.704	0.701	0.708	0.816	0.722	0.760
MM	1.887	1.772	1.724	0.067	0.066	0.066	1.821	1.706	1.658	1.206	1.166	1.050	0.064	0.065	0.064	1.141	1.101	0.987	0.679	0.605	0.672
MSL	1.174	1.156	1.086	0.056	0.056	0.060	1.117	1.100	1.026	0.831	0.749	0.705	0.066	0.067	0.067	0.765	0.683	0.638	0.352	0.417	0.387
MSP	1.404	1.361	1.193	0.078	0.082	0.080	1.326	1.279	1.113	0.872	0.880	0.766	0.063	0.062	0.062	0.809	0.818	0.703	0.517	0.461	0.410

Tabela 9.103 (nastavak): Sadržaj ukupnih antocijana u Merlot vinima

	Ekvivalenti malvidin-3-O-glikozida (mg/L)			µg ekvivalenata malvidin-3-O-glikozida /mg s.e.				µg ekvivalenata malvidin-3-O-glikozida /mL vina			
	1	2	3	1	2	3	srednja vrednost	1	2	3	srednja vrednost
M1	99.30	100.6	99.60	0.709	0.718	0.711	0.713 ± 0.005	25.24	25.56	25.32	25.37 ± 0.167
M2	84.12	90.38	98.15	0.561	0.603	0.654	0.606 ± 0.047	18.43	19.80	21.51	19.92 ± 1.540
M3	358.3	367.8	368.1	2.389	2.452	2.454	2.432 ± 0.037	78.54	80.61	80.70	79.95 ± 1.222
M4	61.87	65.47	71.31	0.412	0.436	0.475	0.441 ± 0.032	15.77	16.68	18.17	16.87 ± 1.213
M5	182.2	173.7	191.0	1.215	1.158	1.274	1.215 ± 0.058	35.89	34.23	37.64	35.92 ± 1.705
M6	137.5	147.1	145.7	0.917	0.981	0.972	0.956 ± 0.034	27.34	29.24	28.97	28.52 ± 1.027
M7	66.89	65.44	61.02	0.446	0.436	0.407	0.430 ± 0.020	13.77	13.47	12.56	13.26 ± 0.629
M8	184.8	186.9	200.5	1.232	1.246	1.337	1.271 ± 0.057	39.08	39.53	42.41	40.34 ± 1.806
M9	64.80	67.06	64.32	0.432	0.447	0.429	0.436 ± 0.010	11.98	12.40	11.89	12.09 ± 0.270
M10	82.20	86.47	87.42	0.548	0.576	0.583	0.569 ± 0.019	20.34	21.39	21.63	21.12 ± 0.687
M11	228.8	217.6	212.1	1.526	1.451	1.414	1.464 ± 0.057	48.07	45.72	44.56	46.12 ± 1.788
M12	30.72	28.11	28.69	0.205	0.187	0.191	0.195 ± 0.009	8.421	7.707	7.866	7.998 ± 0.375
MFR	646.3	618.1	732.1	2.154	2.060	2.440	2.250 ± 0.269	83.85	80.19	94.98	86.34 ± 10.46
MIT	359.4	318.1	334.7	1.198	1.060	1.116	1.125 ± 0.069	34.91	30.90	32.51	32.77 ± 2.017
MMA	299.2	266.4	295.8	0.997	0.888	0.986	0.957 ± 0.060	34.81	31.01	34.42	33.41 ± 2.093
MSL	155.0	183.8	170.6	0.517	0.613	0.569	0.543 ± 0.037	15.18	18.01	16.71	16.63 ± 1.413
MSP	227.8	203.0	180.3	0.759	0.677	0.601	0.679 ± 0.053	29.24	26.06	23.15	24.61 ± 2.057

Tabela 9.104. Analiza glavnih komponenti (PCA) rezultata HPLC-UV/VIS kvantitativne analize sadržaja fenolnih kiselina, flavonoida, stilbena) u Merlot vinima doprinso varijali za 5 glavnih faktora opterećenja (loadings)

Variable	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5
GA – galna kiselina	-0.2100	-0.0864	0.5339	-0.5980	0.4857
VA – vanilinska kiselina	0.4070	0.4640	0.5705	-0.3039	-0.2229
CA – kafena kiselina	-0.4644	-0.2233	0.5429	0.4855	0.1202
pCA - p-kumarinska kiselina	-0.5591	0.5071	-0.4334	-0.0404	0.0859
SA - siringinska kiselina	-0.4677	-0.6842	-0.1143	-0.2144	0.0721
BA - benzoeva kiselina	0.0928	-0.4873	-0.3974	-0.6210	0.2731
tCA - <i>trans</i> -cimetna kiselina	0.5720	0.0741	-0.1672	0.1378	0.2052
CAT - katehin	0.5123	-0.2592	-0.0265	-0.2326	-0.5351
NA - naringenin	0.7147	0.2547	-0.1848	0.1680	0.4884
QU - kvercetin	-0.3739	0.8247	-0.2077	-0.1548	0.0248
KA - kemferol	0.8182	-0.1584	-0.0363	0.2913	0.3652
HE - hesperetin	0.4501	0.7047	0.3069	-0.2072	0.1249
RU - rutin	-0.5301	0.7426	-0.1598	-0.0019	0.0299
RE - rezveratrol	-0.8099	-0.1492	0.1931	0.1549	0.2682
Eigenvalues	4.0145	3.1484	1.528461	1.396	1.176
Total variance (%)	28.675	22.489	10.92	9.970	8.404
Cumulative variance (%)	28.675	51.16	62.08	72.05	80.46

Tabela 9.105. Analiza glavnih komponenti (PCA) rezultata HPLC-UV/VIS kvantitativne analize (sadržaja antocijana) u Merlot vinima- doprinso varijabli za 5 glavnih faktora opterećenja (loadings)

Variable	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5
D-3-G - Delphinidin 3- <i>O</i> -glucoside	-0.9802	0.0324	-0.1858	0.0559	-0.0201
C-3-G - Cyanidin 3- <i>O</i> -glucoside	-0.9173	0.3702	0.1261	0.0738	-0.0009
PT-3-G - Petunidin 3- <i>O</i> -glucoside	-0.9855	-0.1540	-0.0391	0.0461	0.0354
PN-3-G - Peonidin 3- <i>O</i> -glucoside	-0.9775	0.1136	-0.0124	-0.1771	0.0019
M-3-G - Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside	-0.9251	-0.3574	0.1267	0.0054	-0.0174
Eigenvalues	4.5851	0.3025	0.0682	0.0421	0.0019
Total variance (%)	91.70	6.05	1.36	0.84	0.03
Cumulative variance (%)	91.70	97.75	99.11	99.96	100

9.4.2. Uticaj Merlot vina na produkciju PGE₂ i TXA₂ u LPS-stimulisanim makrofagama

Tabela 9.106. Uticaj vina na produkciju PGE₂ u LPS-stimulisanim makrofagama

	Radna c μg/mL	Odnos površine pika PGE ₂ i PGB ₂ (PGE ₂ /PGB ₂)			Odnos PGE ₂ /PGB ₂ u radnim probama i kontroli				
		1	2	3	1	2	3	Srednja vrednost	p
M1	150.0	0.860	0.985	0.960	80.86	92.54	90.22	87.87 ± 6.181	0.064
Kontrola		1.121	1.005	1.067	105.3	94.46	100.2	100.0 ± 5.432	
M2	150.0	0.685	0.444	0.444	115.7	74.93	74.90	74.92 ± 0.022	0.160
Kontrola		0.419	0.631	0.555	70.77	106.43	93.57	100.0 ± 9.087	
M3	150.0	0.992	0.969	0.840	93.18	91.05	78.96	92.11 ± 1.068	0.118
Kontrola		1.121	1.005	1.067	105.3	94.46	100.2	100.0 ± 5.432	
M4	150.0	0.541	0.535	0.628	70.61	69.84	82.09	70.23 ± 0.383	0.044
Kontrola		0.748	0.539	0.783	97.68	70.38	102.3	100.0 ± 3.284	
M5	150.0	0.497	0.490	0.439	83.91	82.65	74.16	80.24 ± 5.300	0.151
Kontrola		0.419	0.631	0.555	70.77	106.43	93.57	100.0 ± 9.087	
M6	150.0	0.766	0.891	0.763	72.03	83.72	71.66	71.85 ± 0.188	0.012
Kontrola		1.121	1.005	1.067	105.3	94.46	100.23	100.0 ± 5.432	
M7	150.0	0.401	0.496	0.467	67.70	83.65	78.89	76.75 ± 8.187	0.096
Kontrola		0.419	0.631	0.555	70.77	106.43	93.57	100.0 ± 9.087	
M8	150.0	1.075	0.906	0.861	96.93	81.72	77.68	79.70 ± 2.020	0.096
Kontrola		1.059	0.951	1.158	95.53	85.79	104.5	100.0 ± 9.343	
M9	150.0	0.842	0.762	0.883	79.16	71.59	82.98	81.07 ± 1.911	0.015
Kontrola		1.121	1.005	1.067	105.3	94.46	100.2	100.0 ± 5.432	
M10	150.0	1.181	0.677	0.761	107.6	61.67	69.30	65.48 ± 3.818	0.013
Kontrola		1.173	1.136	0.984	106.8	103.5	89.67	100.0 ± 9.099	
M11	150.0	0.721	0.772	0.747	65.67	70.34	68.01	68.01 ± 2.333	0.020
Kontrola		1.173	1.136	0.984	106.8	103.5	89.67	100.0 ± 9.099	
M12	150.0	0.804	1.001	0.977	75.57	94.03	91.83	92.93 ± 1.100	0.143
Kontrola		1.121	1.005	1.067	105.3	94.46	100.2	100.0 ± 5.435	
MFR	150.0	1.101	1.325	1.360	77.01	92.67	95.09	88.26 ± 9.811	0.174
Kontrola		1.424	1.437	1.429	99.59	100.5	99.90	100.0 ± 0.464	
MITA	150.0	1.199	1.181	0.972	83.86	82.60	67.96	78.14 ± 8.843	0.051
Kontrola		1.424	1.437	1.429	99.59	100.5	99.90	100.0 ± 0.464	
MMA	150.0	1.222	0.927	1.118	85.43	64.83	78.18	76.15 ± 10.45	0.058
Kontrola		1.424	1.437	1.429	99.59	100.5	99.90	100.0 ± 0.464	
MSL	150.0	1.173	1.315	1.263	82.04	91.97	88.29	87.44 ± 5.019	0.048
Kontrola		1.424	1.437	1.429	99.59	100.5	99.90	100.0 ± 0.464	
MSP	150.0	1.134	1.423	1.424	79.31	99.46	99.56	92.78 ± 11.67	0.396
Kontrola		1.424	1.437	1.429	99.59	100.5	99.90	100.0 ± 0.464	

Tabela 9.107. Uticaj vina na produkciju TXA₂ u LPS-stimulisanim makrofagama

	Radna c μg/mL	Odnos površine pika TXA ₂ i PGB ₂ (TXA ₂ /PGB ₂)			Odnos TXA ₂ /PGB ₂ u radnim probama i kontroli				
		1	2	3	1	2	3	Srednja vrednost	p
M1	150.0	0.018	0.026	0.023	66.91	99.67	86.85	93.26 ± 6.411	0.474
Kontrola		0.027	0.023	0.026	102.8	88.04	97.21	100.0 ± 3.941	
M2	150.0	0.142	0.104	0.106	113.9	83.06	84.61	83.84 ± 0.775	0.193
Kontrola		0.095	0.132	0.118	76.24	105.2	94.75	100.0 ± 7.419	
M3	150.0	0.018	0.027	0.019	66.97	103.3	73.71	70.34 ± 3.371	0.023
Kontrola		0.027	0.023	0.026	102.8	88.04	97.21	100.0 ± 3.941	
M4	150.0	0.025	0.024	0.035	73.25	70.26	102.8	71.76 ± 1.492	0.010
Kontrola		0.035	0.020	0.034	102.0	56.83	98.04	100.0 ± 2.773	
M5	150.0	0.082	0.131	0.089	65.44	105.1	71.13	68.29 ± 2.846	0.057
Kontrola		0.095	0.132	0.118	76.24	105.2	94.75	100.0 ± 7.419	
M6	150.0	0.018	0.023	0.020	68.55	88.03	75.75	72.15 ± 3.601	0.030
Kontrola		0.027	0.023	0.026	102.8	88.04	97.21	100.0 ± 3.941	
M7	150.0	0.102	0.104	0.119	81.93	83.54	94.81	82.73 ± 0.804	0.181
Kontrola		0.095	0.132	0.118	76.24	105.2	94.75	100.0 ± 7.419	
M8	150.0	0.039	0.035	0.030	85.32	75.80	65.57	70.69 ± 5.114	0.108
Kontrola		0.038	0.046	0.046	83.26	100.4	99.57	100.0 ± 0.607	
M9	150.0	0.019	0.017	0.020	72.56	64.53	75.02	70.70 ± 5.489	0.007
Kontrola		0.027	0.023	0.026	102.8	88.04	97.21	100.0 ± 3.941	
M10	150.0	0.038	0.018	0.040	76.95	36.69	80.82	78.88 ± 1.935	0.025
Kontrola		0.043	0.050	0.050	85.68	99.01	101.0	100.0 ± 6.799	
M11	150.0	0.026	0.031	0.028	51.39	61.87	56.63	56.63 ± 5.242	0.003
Kontrola		0.043	0.050	0.050	85.68	99.01	101.0	100.0 ± 1.400	
M12	150.0	0.021	0.022	0.025	81.57	84.55	95.95	83.06 ± 1.491	0.057
Kontrola		0.027	0.023	0.026	102.8	88.04	97.21	100.0 ± 3.941	
MFRA	150.0	0.030	0.033	0.034	51.16	56.54	58.22	55.31 ± 3.691	0.010
Kontrola		0.055	0.056	0.066	93.70	94.56	111.7	100.0 ± 10.17	
MITA	150.0	0.024	0.036	0.030	40.03	61.67	51.39	56.53 ± 7.265	0.013
Kontrola		0.055	0.056	0.066	93.70	94.56	111.7	100.0 ± 10.17	
MMA	150.0	0.032	0.025	0.057	55.14	43.31	97.35	49.22 ± 8.364	0.013
Kontrola		0.055	0.056	0.066	93.70	94.56	111.7	100.0 ± 10.17	
MSL	150.0	0.025	0.032	0.081	42.08	53.69	137.5	47.89 ± 8.206	0.011
Kontrola		0.055	0.056	0.066	93.70	94.56	111.7	100.0 ± 10.17	
MSP	150.0	0.052	0.058	0.054	88.68	98.29	92.38	90.53 ± 2.611	0.245
Kontrola		0.055	0.056	0.066	93.70	94.56	111.7	100.0 ± 10.17	

Tabela 9.108. Uticaj uzorka vina M4 na ekspresiju cPLA₂α, COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2, cPGES i TXAS mRNK u LPS-stimulisanim makrofagama

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	p
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Uzorak	23.45	19.37	4.080	0.05913	0.05233	0.628	0.556 ± 0.125
	23.45	19.37	4.080	0.05913		0.628	
	24.36	19.67	4.690	0.03874		0.412	
Kontrola	23.01	19.59	3.420	0.09343	0.09408	0.993	1.000 ± 0.012
	22.70	19.28	3.420	0.09343		0.993	
	22.29	18.90	3.390	0.09539		1.014	
	COX-1	GAPDH					
Uzorak	25.85	19.37	6.480	0.01120	0.01473	1.941	1.748 ± 0.273
	24.88	19.50	5.380	0.02401		4.160	
	26.47	19.67	6.800	0.00897		1.555	
Kontrola	26.79	19.59	7.200	0.00680	0.00577	1.178	1.000 ± 0.252
	27.00	19.28	7.720	0.00474		0.822	
	28.13	18.90	9.230	0.00167		0.289	
	COX-2	GAPDH					
Uzorak	20.63	19.37	1.260	0.41754	0.38090	0.748	0.864 ± 0.164
	20.37	19.50	0.870	0.54715		0.980	
	22.16	19.67	2.490	0.17801		0.319	
Kontrola	20.83	19.59	1.240	0.42337	0.55819	0.758	1.000 ± 0.241
	20.12	19.28	0.840	0.55864		1.001	
	19.43	18.9	0.530	0.69255		1.241	
	mPGES-1	GAPDH					
Uzorak	32.76	18.60	14.16	0.00005	0.00005	0.870	0.934 ± 0.091
	32.46	18.50	13.96	0.00006		0.999	
	34.11	19.08	15.03	0.00003		0.476	
Kontrola	32.80	19.05	13.75	0.00007	0.00006	1.155	1.000 ± 0.155
	32.95	18.75	14.20	0.00005		0.846	
	32.18	18.22	13.96	0.00006		0.999	
	mPGES-2	GAPDH					
Uzorak	25.28	18.60	6.680	0.00975	0.00923	1.366	1.292 ± 0.277
	25.02	18.50	6.520	0.01090		1.526	
	26.23	19.08	7.150	0.00704		0.986	
Kontrola	25.90	19.05	6.850	0.00867	0.00714	1.214	1.000 ± 0.192
	25.96	18.75	7.210	0.00675		0.946	
	25.60	18.22	7.380	0.00600		0.841	
	cPGES	GAPDH					
Uzorak	22.36	18.60	3.760	0.07381	0.07717	1.066	1.115 ± 0.170
	22.39	18.50	3.890	0.06745		0.974	
	22.55	19.08	3.470	0.09025		1.304	
Kontrola	22.14	19.05	3.090	0.11744	0.06923	1.696	1.000 ± 0.083
	22.69	18.75	3.940	0.06515		0.941	
	21.99	18.22	3.770	0.07330		1.059	
	TXAS	GAPDH					
Uzorak	23.56	18.60	4.960	0.03213	0.04240	0.846	1.117 ± 0.296
	23.12	18.50	4.620	0.04067		1.071	
	23.28	19.08	4.200	0.05441		1.434	
Kontrola	23.40	19.05	4.350	0.04904	0.03796	1.292	1.000 ± 0.258
	23.61	18.75	4.860	0.03443		0.907	
	23.26	18.22	5.040	0.03040		0.801	

Tabela 9.109. Uticaj uzorka vina M10 na ekspresiju cPLA₂ α , COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2, cPGES i TXAS mRNK u LPS-stimulisanim makrofagama

	Ct	Ct	Δ Ct	$2^{-\Delta$ Ct}	Srednje $2^{-\Delta$ Ct}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α GAPDH						
Uzorak	23.14	18.65	4.490	0.04450	0.04808	0.473	0.511 \pm 0.052
	22.75	18.53	4.220	0.05366			
	23.01	18.57	4.440	0.04607			
Kontrola	23.01	19.59	3.420	0.09343	0.09408	0.993	1.000 \pm 0.012
	22.70	19.28	3.420	0.09343			
	22.29	18.90	3.390	0.09539			
	COX-1 GAPDH						
Uzorak	25.40	18.65	6.750	0.00929	0.00803	1.610	1.391 \pm 0.199
	25.54	18.53	7.010	0.00776			
	25.72	18.57	7.150	0.00704			
Kontrola	26.79	19.59	7.200	0.00680	0.00577	1.178	1.000 \pm 0.252
	27.00	19.28	7.720	0.00474			
	28.13	18.90	9.230	0.00167			
	COX-2 GAPDH						
Uzorak	19.97	18.65	1.320	0.40053	0.37747	0.718	0.676 \pm 0.156
	19.68	18.53	1.150	0.45063			
	20.40	18.57	1.830	0.28126			
Kontrola	20.83	19.59	1.240	0.42337	0.55819	0.758	1.000 \pm 0.241
	20.12	19.28	0.840	0.55864			
	19.43	18.90	0.530	0.69255			
	mPGES-1 GAPDH						
Uzorak	32.92	18.47	14.45	0.00004	0.00005	0.711	0.633 \pm 0.111
	32.01	18.13	13.88	0.00007			
	32.99	18.18	14.81	0.00003			
Kontrola	32.80	19.05	13.75	0.00007	0.00006	1.155	1.000 \pm 0.155
	32.95	18.75	14.20	0.00005			
	32.18	18.22	13.96	0.00006			
	mPGES-2 GAPDH						
Uzorak	25.37	18.47	6.900	0.00837	0.00688	1.172	0.963 \pm 0.210
	25.31	18.13	7.180	0.00690			
	25.72	18.18	7.540	0.00537			
Kontrola	25.90	19.05	6.850	0.00867	0.00714	1.214	1.000 \pm 0.192
	25.96	18.75	7.210	0.00675			
	25.60	18.22	7.380	0.00600			
	cPGES GAPDH						
Uzorak	21.83	18.47	3.360	0.09740	0.09181	1.407	1.326 \pm 0.075
	21.59	18.13	3.460	0.09087			
	21.7	18.18	3.520	0.08717			
Kontrola	22.14	19.05	3.090	0.11744	0.06923	1.696	1.000 \pm 0.406
	22.69	18.75	3.940	0.06515			
	21.99	18.22	3.770	0.07330			
	TXAS GAPDH						
Uzorak	22.87	18.47	4.400	0.04737	0.04412	1.248	1.162 \pm 0.107
	22.59	18.13	4.460	0.04544			
	22.84	18.18	4.660	0.03955			
Kontrola	23.40	19.05	4.350	0.04904	0.03796	1.292	1.000 \pm 0.258
	23.61	18.75	4.860	0.03443			
	23.26	18.22	5.040	0.03040			

8.5. Polifenolna jedinjenja kao modulatori produkcije PGE₂ i TXA₂

Tabela 9.110. Uticaj flavona na produkciju PGE₂ u nestimulisanim monocitima

	Radna c μmol/L	Odnos površine pika PGE ₂ i PGB ₂ (PGE ₂ /PGB ₂)			Odnos PGE ₂ /PGB ₂ u radnim probama i kontroli				p
		1	2	3	1	2/	3	Srednja vrednost	
Apigenin	2.5	0.063	0.051	0.058	79.33	64.16	74.12	72.54 ± 7.706	0.010
Kontrola		0.078	0.076	0.084	98.05	96.31	105.6	100.0 ± 4.956	
Apigenin-7-O-glukozid	25	0.070	0.053	0.060	82.08	61.91	70.14	66.03 ± 5.819	0.019
Kontrola		0.075	0.089	0.092	88.03	104.0	107.9	100.0 ± 10.54	
Apigenin-7-O-glukozid	2.5	0.065	0.064	0.050	76.63	75.57	58.72	76.10 ± 0.745	0.058
Kontrola		0.075	0.089	0.092	88.03	104.0	107.9	100.0 ± 10.54	
Apigenin-7-O-glukuronid	25	0.058	0.066	0.060	72.92	83.05	75.94	77.31 ± 5.202	0.005
Kontrola		0.078	0.076	0.084	98.05	96.31	105.6	100.0 ± 4.956	
Apigenin-7-O-glukuronid	2.5	0.053	0.065	0.067	67.01	82.61	84.97	83.79 ± 1.671	0.019
Kontrola		0.078	0.076	0.084	98.05	96.31	105.6	100.0 ± 4.956	
Luteolin	2.5	0.000	0.051	0.050		64.02	62.87	63.44 ± 0.811	0.0047
Kontrola		0.078	0.076	0.084	98.05	96.31	105.6	100.0 ± 4.956	
Luteolin-7-O-glukozid	25	0.058	0.058	0.048	68.14	67.76	56.66	64.19 ± 6.52	0.0112
Kontrola		0.075	0.089	0.092	88.03	104.0	107.9	100.0 ± 10.54	
Luteolin-7-O-glukozid	2.5	0.065	0.043	0.065	76.43	50.78	76.61	76.52 ± 0.13	0.061
Kontrola		0.075	0.089	0.092	88.03	104.0	107.9	100.0 ± 10.54	
Luteolin-7-O-glukuronid	25	0.044	0.036	0.046	55.21	45.23	57.75	52.73 ± 6.619	0.001
Kontrola		0.078	0.076	0.084	98.05	96.31	105.6	100.0 ± 4.956	
Luteolin-7-O-glukuronid	2.5	0.053	0.044	0.063	66.66	55.32	80.09	60.99 ± 8.018	0.047
Kontrola		0.078	0.076	0.084	98.05	96.31	105.6	100.0 ± 4.956	

Tabela 9.111. Uticaj fenolnih kiselina, flavan-3-ola, flavonola i stilbena na produkciju PGE₂ u nestimulisanim monocitima

	Radna c μmol/L	Odnos površine pika PGE ₂ i PGB ₂ (PGE ₂ /PGB ₂)						Odnos PGE ₂ /PGB ₂ u radnim probama i kontroli						Srednja vrednost	p
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6		
Galna k.	25.0	0.251	0.274	0.306	0.309	0.327	0.310	56.81	62.11	69.30	70.12	74.21	70.34	67.15 ±6.416	0.000
Kontrola		0.427	0.402	0.422	0.480	0.504	0.412	96.89	91.12	95.60	108.8	114.3	93.28	100.0 ± 9.331	
Galna k.	2.50	0.181	0.182	0.171	0.165			82.60	83.08	78.26	75.59			79.88 ±3.593	0.020
Kontrola		0.186	0.189	0.216	0.204	0.259	0.259	84.93	86.65	98.62	93.21	118.3	118.3	100.0 ± 14.99	
Hlorogenska k.	25.0	0.047	0.043	0.057				59.47	55.09	71.74				57.28 ±3.097	0.006
Kontrola		0.078	0.076	0.084				98.05	96.31	105.6				100.0 ±4.956	
Hlorogenska k.	2.50	0.049	0.000	0.052				62.46		66.17				64.32 ± 2.624	0.002
Kontrola		0.078	0.076	0.084				98.05	96.31	105.6				100.0 ±4.956	
Kafena k.	25.0	0.311	0.328	0.339	0.362	0.242	0.254	70.56	74.29	76.77	82.06	54.92	57.67	69.38 ± 10.83	0.000
Kontrola		0.427	0.402	0.422	0.480	0.504	0.412	96.89	91.12	95.60	108.8	114.3	93.28	100.0 ± 9.331	
Kafena k.	2.50	0.171	0.160	0.157	0.167	0.149	0.150	78.43	73.14	71.90	76.61	68.27	68.44	72.80 ±4.164	0.006
Kontrola		0.186	0.189	0.216	0.204	0.259	0.259	84.93	86.65	98.62	93.21	118.3	118.3	100.0 ± 14.99	
Epikatehin	25.0	0.315	0.325	0.355	0.347	0.374	0.383	71.44	73.67	80.46	78.67	84.72	86.84	79.30 ±6.023	0.002
Kontrola		0.427	0.402	0.422	0.480	0.504	0.412	96.89	91.12	95.60	108.8	114.3	93.28	100.0 ± 9.331	
Epikatehin	2.50	0.366	0.369	0.400	0.422	0.438	0.432	82.87	83.68	90.65	95.71	99.22	97.85	91.66 ±7.124	0.115
Kontrola		0.427	0.402	0.422	0.480	0.504	0.412	96.89	91.12	95.60	108.8	114.3	93.28	100.0 ± 9.331	
Katehin	25.0	0.348	0.373	0.358	0.380	0.421		78.81	84.48	81.17	86.06	95.39		82.63 ±3.260	0.005
Kontrola		0.427	0.402	0.422	0.480	0.504	0.412	96.89	91.12	95.60	108.8	114.3	93.28	100.0 ± 9.331	
Katehin	2.50	0.412	0.449	0.355	0.363	0.329	0.357	93.33	101.3	80.51	82.19	74.65	80.99	79.59 ±3.364	0.002
Kontrola		0.427	0.402	0.422	0.480	0.504	0.412	96.89	91.12	95.60	108.8	114.3	93.28	100.0 ± 9.331	
Miricetin	2.50	0.221	0.184	0.168	0.164	0.130	0.133	101.0	84.36	76.71	74.9	59.66	60.64	67.98 ±9.079	0.003
Kontrola		0.186	0.189	0.216	0.204	0.259	0.259	84.93	86.65	98.62	93.21	118.3	118.3	100.0 ±14.99	
Rezveratrol	25.0	0.276	0.283	0.323	0.333	0.349	0.381	62.61	64.08	73.31	75.55	79.04	86.36	70.92 ± 7.229	0.001
Kontrola		0.427	0.402	0.422	0.480	0.504	0.412	96.89	91.12	95.60	108.8	114.3	93.28	100.0 ± 9.331	
Rezveratrol	2.50	0.195	0.172	0.180	0.165	0.165	0.159	89.40	78.79	82.53	75.46	75.40	72.71	79.05 ± 6.094	0.017
Kontrola		0.186	0.189	0.216	0.204	0.259	0.259	84.93	86.65	98.62	93.21	118.3	118.3	100.0 ±14.99	

Tabela 9.112. Uticaj ursolne kiseline i aukubina na produkciju PGE₂ u nestimulisanim monocitima

	Radna c μmol/L	Odnos površine pika PGE ₂ i PGB ₂ (PGE ₂ /PGB ₂)				Odnos PGE ₂ /PGB ₂ u radnim probama i kontroli					
		1	2	3	4	1	2	3	4	Srednja vrednost	p
Ursolna k.	2.50	0.044	0.050	0.041		64.64	73.99	59.60		66.08 ±7.303	0.006
Kontrola		0.065	0.065	0.074	0.056	94.86	96.00	109.1	82.43	100.0 ±7.933	
Aukubin	2.50	0.044	0.067	0.052		64.00	98.62	76.69		70.35 ±8.972	0.061
Kontrola		0.065	0.065	0.074	0.056	94.86	96.00	109.1	82.43	100.0 ±7.933	

Tabela 9.113. Uticaj standardnih COX inhibitora na produkciju PGE₂ u nestimulisanim monocitima

PGE	Radna c μmol/L	Odnos površine pika PGE ₂ i PGB ₂ (PGE ₂ /PGB ₂)				Odnos PGE ₂ /PGB ₂ u radnim probama i kontroli					
		1	2	3	4	1	2	3	4	Srednja vrednost	p
Aspirin	2.50	0.057	0.041	0.055		67.18	48.36	64.41		65.80 ±1.958	0.026
Kontrola		0.075	0.089	0.092		88.03	104.1	107.9		100.0 ±10.54	
Celekoksib	2.50	0.044	0.059	0.057		64.52	86.80	83.81		85.30 ±2.115	0.074
Kontrola		0.065	0.065	0.074	0.056	94.86	96.00	109.1	82.43	100.0 ±7.933	
Indometacin	2.50	0.052	0.050	0.048		76.81	73.07	71.04		73.64 ±2.926	0.019
Kontrola		0.065	0.065	0.074	0.056	94.86	96.00	109.1	82.43	100.0 ±7.933	
SC560	0.03	0.247	0.247	0.197	0.183	92.59	92.60	73.75	68.68	81.90 ±12.52	0.056
Kontrola		0.277	0.289	0.250	0.252	103.9	108.1	93.76	94.30	100.0 ± 7.108	

Tabela 9.114. Uticaj flavona na produkciju TXA₂ u nestimulisanim monocitima

	Radna c μmol/L	Odnos površine pika TXA ₂ i PGB ₂ (TXA ₂ /PGB ₂)			Odnos TXA ₂ /PGB ₂ u radnim probama i kontroli				
		1	2	3	1	2/	3	Srednja vrednost	p
Apigenin	2.50	0.054	0.053	0.066	60.34	59.62	74.25	64.73 ± 8.25	0.017
Kontrola		0.094	0.096	0.077	105.7	107.9	86.38	100.0 ± 11.84	
Apigenin-7-O-glukozid	25.0	0.058	0.038	0.041	70.71	46.55	50.58	48.57 ± 2.849	0.019
Kontrola		0.076	0.095	0.075	92.44	116.0	91.55	100.0 ± 13.87	
Apigenin-7-O-glukozid	2.50	0.037	0.060	0.073	44.99	72.70	89.17	80.94 ± 11.64	0.209
Kontrola		0.076	0.095	0.075	92.44	116.0	91.55	100.0 ± 13.87	
Apigenin-7-O-glukuronid	25.0	0.070	0.069	0.070	78.10	76.71	78.46	77.76 ± 0.923	0.082
Kontrola		0.094	0.096	0.077	105.7	107.9	86.38	100.0 ± 11.84	
Apigenin-7-O-glukuronid	2.50	0.059	0.080	0.037	65.87	89.02	41.17	77.45 ± 16.36	0.255
Kontrola		0.094	0.096	0.077	105.7	107.9	86.38	100.0 ± 11.84	
Luteolin	2.50	0.057	0.052	0.031	64.02	58.61	35.21	61.32 ± 3.83	0.020
Kontrola		0.094	0.096	0.077	105.7	107.9	86.38	100.0 ± 11.84	
Luteolin-7-O-glukozid	25.0	0.063	0.058	0.057	76.58	70.87	69.84	72.43 ± 3.630	0.067
Kontrola		0.076	0.095	0.075	92.44	116.0	91.55	100.0 ± 13.87	
Luteolin-7-O-glukozid	2.50	0.033	0.053	0.071	40.09	64.72	87.02	75.87 ± 15.76	0.219
Kontrola		0.076	0.095	0.075	92.44	116.0	91.55	100.0 ± 13.87	
Luteolin-7-O-glukuronid	25.0	0.022	0.058	0.069	25.12	65.45	76.76	71.10 ± 8.00	0.049
Kontrola		0.094	0.096	0.077	105.7	107.9	86.38	100.0 ± 11.84	
Luteolin-7-O-glukuronid	2.50	0.053	0.017	0.045	59.71	19.14	50.14	54.92 ± 6.776	0.024
Kontrola		0.094	0.096	0.077	105.7	107.9	86.38	100.0 ± 11.84	

Tabela 9.115. Uticaj fenolnih kiselina, flavan-3-ola, flavonola i stilbena na produkciju TXA₂ u nestimulisanim monocitima

	Radna c μmol/L	Odnos površine pika TXA ₂ i PGB ₂ (TXA ₂ /PGB ₂)						Odnos TXA ₂ /PGB ₂ u radnim probama i kontroli						Srednja vrednost	p
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6		
Galna k.	25.0	0.043	0.035	0.055	0.053	0.093	0.063	67.34	54.52	86.57	83.69	146.3	99.69	73.03 ± 14.97	0.030
Kontrola		0.053	0.031	0.062	0.065	0.077	0.061	83.43	48.56	97.69	102.3	120.9	95.65	100.0 ± 13.63	
Galna k.	2.50	0.075	0.069	0.073	0.072			92.48	84.89	89.33	88.91			88.90 ± 3.114	0.001
Kontrola		0.084	0.078	0.082	0.082	0.082	0.073	102.8	95.98	101.0	100.1	100.03	89.04	100.0 ± 2.509	
Hlorogenska k.	25.0	0.034	0.035	0.075				37.79	38.90	83.75				38.34 ± 0.790	0.011
Kontrola		0.094	0.096	0.077				105.7	107.9	86.38				100.0 ± 11.84	
Hlorogenska k.	2.50	0.071	0.075	0.066				79.95	83.87	73.94				79.25 ± 5.000	0.077
Kontrola		0.094	0.096	0.077				105.7	107.9	86.38				100.0 ± 11.84	
Kafena k.	25.0	0.057	0.049	0.076	0.066	0.071	0.059	88.88	76.56	120.19	104.16	110.87	93.30	86.24 ± 8.680	0.133
Kontrola		0.053	0.031	0.062	0.065	0.077	0.061	83.43	48.56	97.69	102.3	120.9	95.65	100.0 ± 13.63	
Kafena k.	2.50	0.053	0.051	0.063	0.069	0.057	0.061	64.52	62.93	77.51	84.97	69.62	74.69	72.37 ± 8.354	0.000
Kontrola		0.084	0.078	0.082	0.082	0.082	0.073	102.8	95.98	101.0	100.1	100.03	89.04	100.0 ± 2.509	
Epikatehin	25.0	0.077	0.079	0.045	0.050	0.076	0.062	121.0	124.4	70.89	78.56	119.9	97.59	82.35 ± 13.75	0.147
Kontrola		0.053	0.031	0.062	0.065	0.077	0.061	83.43	48.56	97.69	102.3	120.9	95.65	100.0 ± 13.63	
Epikatehin	2.50	0.050	0.044	0.060	0.055	0.065	0.039	78.67	69.35	94.97	85.75	102.7	61.42	82.19 ± 10.85	0.065
Kontrola		0.053	0.031	0.062	0.065	0.077	0.061	83.43	48.56	97.69	102.3	120.9	95.65	100.0 ± 13.63	
Katehin	25.0	0.041	0.030	0.050	0.040	0.046		64.97	47.05	78.99	63.03	72.18		66.73 ± 4.82	0.003
Kontrola		0.053	0.031	0.062	0.065	0.077	0.061	83.43	48.56	97.69	102.3	120.9	95.65	100.0 ± 13.63	
Katehin	2.50	0.057	0.050	0.058	0.039	0.053	0.038	90.11	78.58	91.58	61.40	83.75	59.18	77.43 ± 14.09	0.025
Kontrola		0.053	0.031	0.062	0.065	0.077	0.061	83.43	48.56	97.69	102.3	120.9	95.65	100.0 ± 13.63	
Miricetin	2.50	0.061	0.070	0.039	0.041	0.060	0.060	74.78	85.92	47.51	49.86	74.16	73.04	74.00 ± 0.882	0.000
Kontrola		0.084	0.078	0.082	0.082	0.082	0.073	102.8	95.98	101.0	100.1	100.03	89.04	100.0 ± 2.509	
Rezveratrol	25.0	0.051	0.040	0.038	0.029	0.059	0.046	79.51	62.26	59.33	92.97	45.09	71.62	68.18 ± 9.20	0.004
Kontrola		0.053	0.031	0.062	0.065	0.077	0.061	83.43	48.56	97.69	102.3	120.9	95.65	100.0 ± 13.63	
Rezveratrol	2.50	0.071	0.078	0.069	0.068	0.080	0.086	86.92	95.70	84.03	83.19	98.07	105.64	87.46 ± 5.720	0.023
Kontrola		0.084	0.078	0.082	0.082	0.082	0.073	102.8	95.98	101.0	100.1	100.03	89.04	100.0 ± 2.509	

Tabela 9.116. Uticaj ursolne kiseline i aukubina na produkciju TXA₂ u nestimulisanim monocitima

	Radna c μmol/L	Odnos površine pika TXA ₂ i PGB ₂ (TXA ₂ /PGB ₂)				Odnos TXA ₂ /PGB ₂ u radnim probama i kontroli				<i>p</i>	
		1	2	3	4	1	2	3	4	Srednja vrednost	p
Ursolna k.	2.5	0.050	0.058	0.052		69.12	80.87	72.56		74.18 ± 6.04	0.017
Kontrola		0.071	0.067	0.066	0.085	98.03	92.39	91.63	118.0	100.0 ± 12.30	
Aukubin	2.5	0.052	0.056	0.051		71.93	77.85	70.39		73.39 ± 3.940	0.017
Kontrola		0.071	0.067	0.066	0.085	98.03	92.39	91.63	118.0	100.0 ± 12.30	

Tabela 9.117. Uticaj standardnih COX inhibitora na produkciju TXA₂ u nestimulisanim monocitima

	Radna c μmol/L	Odnos površine pika TXA ₂ i PGB ₂ (TXA ₂ /PGB ₂)				Odnos TXA ₂ /PGB ₂ u radnim probama i kontroli				<i>p</i>	
		1	2	3	4	1	2	3	4	Srednja vrednost	p
Aspirin	2.50	0.051	0.036	0.045		62.26	43.85	54.99		58.62 ± 5.14	0.023
Kontrola		0.076	0.095	0.075		92.44	116.0	91.55		100.0 ± 0.63	
Celekoksib	2.50	0.040	0.039	0.060		55.51	54.76	82.65		55.13 ± 0.525	0.005
Kontrola		0.071	0.067	0.066	0.085	98.03	92.39	91.63	118.0	100.0 ± 12.30	
Indometacin	2.50	0.052	0.049	0.051		72.69	68.04	70.90		70.55 ± 2.346	0.015
Kontrola		0.071	0.067	0.066	0.085	98.03	92.39	91.63	118.0	100.0 ± 12.30	
SC560	0.03	0.110	0.114	0.107	0.095	56.86	58.86	55.67	49.33	55.18 ± 4.12	0.000
Kontrola		0.186	0.178	0.201	0.206	96.65	92.15	104.3	106.9	100.0 ± 6.80	

Tabela 9.118. Uticaj odabranih fenolnih kiselina, flavona, flavan-3-ola i flavonola na produkciju PGE₂ u LPS-stimulisanim monocitima

	Radna c μmol/L	Odnos površine pika PGE ₂ i PGB ₂ (PGE ₂ /PGB ₂)						Odnos PGE ₂ /PGB ₂ u radnim probama i kontroli						Srednja vrednost	p
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6		
Galna k.	2.50	0.191	0.190	0.180	0.156			96.48	95.69	90.68	78.69			90.39 ± 8.208	0.100
Kontrola		0.190	0.191	0.207	0.206			95.64	96.41	104.1	103.8			100.0 ± 4.599	
Hlorogenska k.	2.50	0.064	0.073	0.067	0.064			75.73	86.56	79.36	75.83			76.97 ± 5.081	0.005
Kontrola		0.064	0.086	0.088	0.088	0.075		75.77	101.7	104.6	104.3	89.42		100.0 ± 7.173	
Kafena k.	2.50	0.183	0.180	0.162				92.23	90.93	81.53				88.23 ± 5.839	0.048
Kontrola		0.190	0.191	0.207	0.206			95.64	96.41	104.1	103.79			100.0 ± 4.599	
Apigenin	2.50	0.060	0.067	0.075	0.075			57.28	64.16	71.68	72.01			66.28 ± 7.013	0.001
Kontrola		0.102	0.108	0.103	0.105	0.102		98.11	103.5	99.37	100.7	98.35		100.0 ± 2.193	
Apigenin-7-O-glukozid	2.50	0.071	0.076	0.081	0.067			68.23	73.17	77.95	64.26			70.90 ± 5.949	0.001
Kontrola		0.102	0.108	0.103	0.105	0.102		98.11	103.5	99.37	100.7	98.35		100.0 ± 2.193	
Luteolin	2.50	0.076	0.067	0.074	0.067			73.25	64.56	71.12	64.64			68.39 ± 4.465	0.000
Kontrola		0.102	0.108	0.103	0.105	0.102		98.11	103.5	99.37	100.7	98.35		100.0 ± 2.193	
Luteolin-7-O-glukozid	2.50	0.070	0.074	0.067	0.080	0.074	0.076	67.04	70.65	64.80	77.13	70.73	73.42	70.63 ± 4.402	0.000
Kontrola		0.102	0.108	0.103	0.105	0.102		98.11	103.5	99.37	100.7	98.35		100.0 ± 2.193	
Epikatehin	2.50	0.193	0.200	0.198	0.193			85.60	89.05	88.05	85.70			87.10 ± 1.72	0.001
Kontrola		0.247	0.232	0.219	0.212	0.222	0.220	109.6	102.9	97.27	93.99	98.68	97.55	100.0 ± 5.52	
Katehin	2.50	0.213	0.234	0.233	0.218			94.58	103.86	103.62	96.64			99.85 ± 5.47	0.976
Kontrola		0.247	0.232	0.183	0.177	0.222	0.220	109.6	102.9	97.27	93.99	98.68	97.55	100.0 ± 1.139	
Miricetin	2.50	0.169	0.162	0.184	0.178	0.155	0.155	85.27	81.49	92.89	89.69	77.92	78.29	84.26 ± 6.139	0.002
Kontrola		0.190	0.191	0.207	0.206	0.189	0.185	95.64	96.41	104.1	103.8			100.0 ± 4.599	
Floretin	1.00	0.075	0.067	0.084	0.088	0.169	0.160	64.14	57.42	71.39	74.74	143.7	136.1	70.09 ± 5.42	0.001
Kontrola		0.147	0.142	0.096	0.086	0.074	0.070	124.9	120.6					100.0 ± 14.23	
		0.110	0.106	0.110	0.104	0.111	0.110	93.42	90.02	93.83	88.79	94.75	93.70		

Tabela 9.119. Uticaj odabranih stilbena, ursolne kiseline, aukubina i standardnih COX inhibitora na produkciju PGE₂ u LPS-stimulisanim monocitima

	Radna c μmol/L	Odnos površine pika PGE ₂ i PGB ₂ (PGE ₂ /PGB ₂)						Odnos PGE ₂ /PGB ₂ u radnim probama i kontroli						Srednja vrednost	p
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6		
Pterostilben	1.00	0.070	0.062	0.075	0.071	0.065	0.064	59.17	52.53	63.71	60.17	55.16	54.27	57.50 ± 4.22	0.000
Kontrola		0.147	0.142	0.096	0.086	0.074	0.070	124.9	120.6					100.0 ± 14.23	
Rezveratrol	2.50	0.159	0.149	0.168	0.162	0.152	0.157	80.36	75.09	84.64	81.72	76.82	79.06	79.62 ± 3.429	0.001
Kontrola		0.190	0.191	0.207	0.206			95.64	96.41	104.1	103.8			100.0 ± 4.599	
Ursolna k.	2.50	0.062	0.067	0.060	0.062			74.20	79.36	71.18	73.34			74.52 ± 3.465	0.001
Kontrola		0.064	0.086	0.088	0.088	0.075		75.77	101.7	104.6	104.3	89.42		100.0 ± 7.173	
Aukubin	2.50	0.052	0.052	0.064	0.059			61.78	61.30	75.53	69.70			67.08 ± 6.825	0.000
Kontrola		0.064	0.086	0.088	0.088	0.075		75.77	101.7	104.6	104.3	89.42		100.0 ± 7.173	
Aspirin	2.50	0.077	0.077	0.106	0.092			70.31	70.14	96.54	83.67			74.71 ± .764	0.023
Kontrola		0.112	0.109	0.109	0.104	0.115	0.110	101.5	99.55	99.31	94.87	104.7	100.1	100.0 ± 3.202	
Celekoksib	2.50	0.064	0.061	0.071	0.070	0.070	0.066	58.54	55.64	64.19	63.57	63.92	60.40	61.04 ± .471	0.000
Kontrola		0.112	0.109	0.109	0.104	0.115	0.110	101.5	99.55	99.31	94.87	104.7	100.1	100.0 ± 3.202	
Indometacin	2.5	0.085	0.084	0.070	0.067			77.43	76.84	63.94	60.96			69.79 ± 8.566	0.004
Kontrola		0.112	0.109	0.109	0.104	0.115	0.110	101.5	99.55	99.31	94.87	104.7	100.1	100.0 ± 3.202	
SC-560	0.03	0.080	0.074	0.073	0.066			72.38	67.68	66.49	59.56			66.53 ± 5.295	0.000
Kontrola		0.112	0.109	0.109	0.104	0.115	0.110	101.5	99.55	99.31	94.87	104.7	100.1	100.0 ± 3.202	

Tabela 9.120. Uticaj odabranih fenolnih kiselina, flavona, flavan-3-ola i flavonola na produkciju TXA₂ u LPS-stimulisanim monocitima

	Radna c μmol/L	Odnos površine pika TXA ₂ i PGB ₂ (TXA ₂ /PGB ₂)						Odnos TXA ₂ /PGB ₂ u radnim probama i kontroli						Srednja vrednost	p
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6		
Galna k.	2.50	0.022	0.018	0.014	0.016			66.33	52.66	40.98	46.30			51.57 ±10.94	0.001
Kontrola		0.032	0.029	0.034	0.034			95.51	86.16	102.70	101.79			100.0 ±3.918	
Hlorogenska k.	2.50	0.035	0.043	0.034	0.032			81.43	99.88	79.30	72.78			77.84 ±4.508	0.002
Kontrola		0.045	0.043	0.042	0.046	0.041		102.48	99.51	96.47	106.62	94.92		100.0 ±4.705	
Kafena k.	2.50			0.025	0.022	0.021				75.91	65.05	63.18		68.05 ±6.873	0.005
Kontrola		0.032	0.029	0.034	0.034			95.51	86.16	102.70	101.79			100.0 ±3.918	
Apigenin	2.50	0.021	0.020	0.027	0.020			51.50	47.97	65.35	49.77			53.64 ± 7.936	0.001
Kontrola		0.014	0.045	0.036	0.038	0.044		34.02	111.0	88.02	93.35	107.7		100.0 ± 11.06	
Apigenin-7-O-glukozid	2.50	0.030	0.030	0.025	0.033			72.80	74.45	61.56	79.87			72.17 ± 7.690	0.008
Kontrola		0.014	0.045	0.036	0.038	0.044		34.02	111.0	88.02	93.35	107.7		100.0 ± 11.06	
Luteolin	2.50	0.021	0.031	0.028	0.033	0.038	0.040	52.04	76.92	69.07	81.47			75.82 ± 6.275	0.016
Kontrola		0.014	0.045	0.036	0.038	0.044		34.02	111.0	88.02	93.35	107.7		100.0 ± 11.06	
Luteolin-7-O-glukozid	2.50	0.016	0.025	0.031	0.030	0.022	0.022	39.85	61.39	74.87	73.50	53.35	53.85	63.39 ± 10.37	0.002
Kontrola		0.014	0.045	0.036	0.038	0.044		34.02	111.0	88.02	93.35	107.7		100.0 ± 11.06	
Epikatehin	2.50	0.017	0.021	0.034	0.037			68.96	83.75	137.9	150.7			110.3 ± 40.02	0.643
Kontrola		0.025	0.023	0.027	0.024	0.023	0.024	103.06	92.07	110.88	99.71	95.29	98.99	100.0 ± 6.542	
Katehin	2.50	0.018	0.021	0.017	0.019			72.37	86.99	67.86	79.07			76.57 ± 8.333	0.004
Kontrola		0.025	0.023	0.027	0.024	0.023	0.024	103.06	92.07	110.88	99.71	95.29	98.99	100.0 ± 6.542	
Miricetin	2.50	0.029	0.027	0.033	0.032	0.014	0.011	87.60	80.84	98.58	94.73	41.65	33.60	87.72 ± 6.948	0.065
Kontrola		0.032	0.029	0.034	0.034			95.51	86.16	102.70	101.79			100.0 ±3.918	
Floretin	1.00	0.018	0.018	0.021	0.021			65.17	67.07	76.47	75.36			71.02 ± 5.677	0.000
Kontrola			0.025	0.027	0.025				92.51	97.33	92.84				
		0.035	0.027	0.024	0.024	0.030	0.029	129.1	97.92	88.15	86.96	110.3	104.9	100.0 ± 13.27	

Tabela 9.121. Uticaj odabranih stilbena, ursolne kiseline, aukubina i standardnih COX inhibitora na produkciju TXA₂ u LPS-stimulisanim monocitima

	Radna c μmol/L	Odnos površine pika TXA ₂ i PGB ₂ (TXA ₂ /PGB ₂)						Odnos TXA ₂ /PGB ₂ u radnim probama i kontroli						Srednja vrednost	
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6		
Pterostilben	1.00	0.013	0.014	0.019	0.019	0.019	0.018	46.23	50.46	69.99	70.70	71.09	66.23	69.50 ± 11.14	0.00
Kontrola		0.025	0.027	0.025					92.51	97.33	92.84			100.0 ± 13.27	
Rezveratrol	2.50	0.019	0.019	0.018	0.018	0.020	0.022	57.31	57.44	54.44	54.95	59.74	67.00	58.48 ± 4.590	0.000
Kontrola		0.032	0.029	0.034	0.034			95.51	86.16	102.70	101.79			100.0 ± 3.918	
Ursolona k.	2.50	0.019	0.021	0.025	0.029			43.24	48.92	57.38	66.49			54.01 ± 10.15	0.001
Kontrola		0.045	0.043	0.042	0.046	0.041		102.48	99.51	96.47	106.62	94.92		100.0 ± 4.705	
Aukubin	2.50	0.019	0.022	0.025	0.026			44.69	50.58	58.13	60.28			53.42 ± 7.156	0.000
Kontrola		0.045	0.043	0.042	0.046	0.041		102.48	99.51	96.47	106.62	94.92		100.0 ± 4.705	
Aspirin	2.50	0.016	0.017	0.018	0.019			51.83	53.24	56.74	62.03			55.96 ± 4.544	0.000
Kontrola		0.034	0.030	0.029	0.027	0.036	0.032	110.0	95.89	91.92	85.35	113.7	103.2	100.0 ± 10.90	
Celekoksib	2.50	0.019	0.015	0.013	0.013	0.019	0.016	61.02	49.01	41.41	42.11	60.09	52.26	46.20 ± 5.300	0.000
Kontrola		0.034	0.030	0.029	0.027	0.036	0.032	110.0	95.89	91.92	85.35	113.7	103.2	100.0 ± 10.90	
Indometacin	2.50	0.011	0.008	0.009	0.009			34.77	25.42	29.05	29.02			29.57 ± 3.867	0.000
Kontrola		0.034	0.030	0.029	0.027	0.036	0.032	110.0	95.89	91.92	85.35	113.7	103.2	100.0 ± 10.90	
SC-560	0.03	0.024	0.020	0.021	0.019			76.62	62.97	66.61	60.53			66.68 ± 7.077	0.000
Kontrola		0.034	0.030	0.029	0.027	0.036	0.032	110.0	95.89	91.92	85.35	113.7	103.2	100.0 ± 10.90	

Tabela 9.122. Uticaj apigenina na ekspresiju *cPLA₂α*, *COX-1*, *COX-2*, *mPGES-1*, *mPGES-2*, *cPGES* i *TXAS* mRNK u LPS-stimulisanim monocitima

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNA/GAPDH mRNA	<i>p</i>
	<i>cPLA₂α</i>	GAPDH				Srednja vrednost	
Uzorak	29.84	15.99	13.85	0.00007	0.00002	3.140	0.771 ± 0.117
	31.62	15.58	16.04	0.00001		0.688	
	31.38	15.65	15.73	0.00002		0.853	
Kontrola	30.06	14.67	15.39	0.00002	0.00002	1.080	1.000 ± 0.072
	29.99	14.46	15.53	0.00002		0.980	
	30.65	15.06	15.59	0.00002		0.940	
	<i>COX-1</i>	GAPDH					
Uzorak	28.43	15.99	12.44	0.00018	0.00015	1.466	1.227 ± 0.211
	28.48	15.58	12.9	0.00013		1.066	
	28.44	15.65	12.79	0.00014		1.150	
Kontrola	27.74	14.67	13.07	0.00012	0.00012	0.947	1.000 ± 0.056
	27.46	14.46	13	0.00012		0.994	
	27.97	15.06	12.91	0.00013		1.058	
	<i>COX-2</i>	GAPDH					
Uzorak	34.30	15.99	18.31	0.00000	0.00000	0.197	0.179 ± 0.023
	33.97	15.58	18.39	0.00000		0.186	
	34.32	15.65	18.67	0.00000		0.153	
Kontrola	30.29	14.67	15.62	0.00002	0.00002	1.270	1.000 ± 0.025
	30.40	14.46	15.94	0.00002		1.017	
	31.05	15.06	15.99	0.00002		0.983	
	<i>mPGES-1</i>	GAPDH					
Uzorak	32.97	15.99	16.98	0.00001	0.00001	1.993	1.920 ± 0.103
	32.74	15.65	17.09	0.00001		1.847	
	32.28	14.67	17.61	0.00000			
Kontrola	32.45	14.46	17.99	0.00000	0.00000	0.990	1.000 ± 0.015
	33.02	15.06	17.96	0.00000		1.010	
	<i>mPGES-2</i>	GAPDH					
Uzorak	29.87	15.99	13.88	0.00007	0.00007	2.056	2.033 ± 0.408
	29.81	15.58	14.23	0.00005		1.613	
	29.29	15.65	13.64	0.00008		2.428	
Kontrola	29.77	14.67	15.10	0.00003	0.00003	0.883	1.000 ± 0.117
	29.22	14.46	14.76	0.00004		1.117	
	29.98	15.06	14.92	0.00003		1.000	
	<i>cPGES</i>	GAPDH					
Uzorak	16.94	15.99	0.95	0.51763	0.51763	1.197	1.197 ± 0.000
	16.53	15.58	0.95	0.51763		1.197	
	16.13	15.65	0.48	0.71698		1.658	
Kontrola	15.97	14.67	1.3	0.40613	0.43237	0.939	1.000 ± 0.089
	15.73	14.46	1.27	0.41466		0.959	
	16.13	15.06	1.07	0.47632		1.102	
	<i>TXAS</i>	GAPDH					
Uzorak	29.56	15.99	13.57	0.00008	0.00009	0.759	0.801 ± 0.059
	29.00	15.58	13.42	0.00009		0.842	
	28.37	15.65	12.72	0.00015		1.369	
Kontrola	27.89	14.67	13.22	0.00010	0.00011	0.968	1.000 ± 0.035
	27.58	14.46	13.12	0.00011		1.037	
	28.24	15.06	13.18	0.00011		0.995	

Tabela 9.123. Uticaj apigenin-7-O-glukozida na ekspresiju *cPLA₂α*, *COX-1*, *COX-2*, *mPGES-1*, *mPGES-2*, *cPGES* i *TXAS* mRNK u LPS-stimulisanim monocitima

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	p
	<i>cPLA₂α</i>	GAPDH				Srednja vrednost	
Uzorak	30.80	15.33	15.47	0.00002	0.00002	1.022	1.051 ± 0.041 0.391
	30.79	15.40	15.39	0.00002		1.080	
	31.01	15.33	15.68	0.00002		0.883	
Kontrola	30.06	14.67	15.39	0.00002	0.00002	1.080	1.000 ± 0.072
	29.99	14.46	15.53	0.00002		0.980	
	30.65	15.06	15.59	0.00002		0.940	
	<i>COX-1</i>	GAPDH					
Uzorak	28.76	15.33	13.43	0.00009	0.00012	0.738	0.981 ± 0.225 0.899
	28.15	15.40	12.75	0.00015		1.183	
	28.29	15.33	12.96	0.00013		1.022	
Kontrola	27.74	14.67	13.07	0.00012	0.00012	0.947	1.000 ± 0.056
	27.46	14.46	13.00	0.00012		0.994	
	27.97	15.06	12.91	0.00013		1.058	
	<i>COX-2</i>	GAPDH					
Uzorak	31.55	15.33	16.22	0.00001	0.00002	0.838	0.829 ± 0.012 0.030
	30.63	15.40	15.23	0.00003		1.664	
	31.58	15.33	16.25	0.00001		0.821	
Kontrola	30.29	14.67			0.00002		1.000 ± 0.025
	30.40	14.46	15.94	0.00002		1.017	
	31.05	15.06	15.99	0.00002		0.983	
	<i>mPGES-1</i>	GAPDH					
Uzorak	30.82	12.58	18.24	0.00000	0.00000	0.832	0.928 ± 0.083 0.271
	32.29	14.29	18	0.00000		0.983	
	32.71	14.69	18.02	0.00000		0.969	
Kontrola	32.28	14.67			0.00000		1.000 ± 0.015
	32.45	14.46	17.99	0.00000		0.990	
	33.02	15.06	17.96	0.00000		1.010	
	<i>mPGES-2</i>	GAPDH					
Uzorak	20.06	14.40	5.66	0.01978	0.01850	1.958	1.832 ± 0.179 0.063
	20.46	14.29					
	20.55	14.69	5.86	0.01722		1.705	
Kontrola	22.35	15.58	6.77	0.00916	0.01010	0.907	1.000 ± 0.087
	21.45	14.93	6.52	0.01090		1.079	
	21.13	14.52	6.61	0.01024		1.014	
	<i>cPGES</i>	GAPDH					
Uzorak	16.08	12.58	3.500	0.08834	0.00000		0.703 ± 0.319 0.417
	36.99	14.56	22.43	0.00000		0.478	
	35.90	14.43	21.47	0.00000		0.929	
Kontrola	35.34	14.30	21.04	0.00000	0.00000	1.252	1.000 ± 0.360
	35.15	14.00	21.15	0.00000		1.160	
	37.23	15.10	22.13	0.00000		0.588	
	<i>TXAS</i>	GAPDH					
Uzorak	28.69	12.58	16.11	0.00001	0.00002	0.582	0.650 ± 0.095 0.048
	30.05	14.56	15.49	0.00002		0.895	
	30.24	14.43	15.81	0.00002		0.717	
Kontrola	29.85	14.30	15.55	0.00002	0.00003	0.858	1.000 ± 0.145
	29.34	14.00	15.34	0.00002		0.993	
	30.23	15.10	15.13	0.00003		1.149	

Tabela.124. 9 Uticaj apigenin-7-O-glukuronida na ekspresiju cPLA₂α, COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2, cPGES i TXAS mRNK u LPS-stimulisanim monocitima

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK		
	cPLA ₂ α	GAPDH					Srednja vrednost	
Uzorak	33.96	18.63	15.33	0.00002	0.00002	1.255	1.240 ± 0.162	0.339
	34.58	19.02	15.56	0.00002		1.070		
	33.91	18.73	15.18	0.00003		1.393		
Kontrola	32.66	16.48	16.18	0.00001	0.00002	0.696	1.000 ± 0.327	
	33.13	17.9	15.23	0.00003		1.345		
	33.95	18.23	15.72	0.00002		0.958		
	COX-1	GAPDH						
Uzorak	30.81	18.63	12.18	0.00022	0.00024	1.663	1.884 ± 0.229	0.014
	30.85	19.02	11.83	0.00027		2.119		
	30.74	18.73	12.01	0.00024		1.871		
Kontrola	29.40	16.48	12.92	0.00013	0.00013	0.996	1.000 ± 0.080	
	30.93	17.90	13.03	0.00012		0.922		
	31.03	18.23	12.80	0.00014		1.082		
	COX-2	GAPDH						
Uzorak	43.22	17.30	25.92	0.00000		0.191	0.134 ± 0.081	0.021
	45.03	17.79	27.24	0.00000		0.077		
Kontrola	38.06	14.9	23.16	0.00000	0.00000	1.296	1.000 ± 0.266	
	40.24	16.35	23.89	0.00000		0.781		
	40.69	17.04	23.65	0.00000		0.923		
	mPGES-1	GAPDH						
Uzorak	29.83	18.63	11.20	0.00043	0.00038	1.880	1.684 ± 0.248	0.057
	30.31	19.02	11.29	0.00040		1.767		
	30.35	18.73	11.62	0.00032		1.405		
Kontrola	29.34	16.48	12.86	0.00013	0.00023	0.595	1.000 ± 0.351	
	29.73	17.9	11.83	0.00027		1.215		
	30.09	18.23	11.86	0.00027		1.190		
	mPGES-2	GAPDH						
Uzorak	26.69	18.63	8.060	0.00375	0.00461	0.546	0.734 ± 0.117	0.041
	26.74	19.02	7.720	0.00474		0.691		
	26.28	18.73	7.550	0.00534		0.777		
Kontrola	23.86	16.48	7.380	0.00600	0.00687	0.874	1.000 ± 0.147	
	25.14	17.90	7.240	0.00662		0.964		
	25.20	18.23	6.970	0.00798		1.162		
	cPGES	GAPDH						
Uzorak	23.03	18.63	4.400	0.04737	0.07352	0.611	0.948 ± 0.294	0.790
	22.59	19.02	3.570	0.08420		1.086		
	22.22	18.73	3.490	0.08900		1.148		
Kontrola	20.14	16.48	3.660	0.07911	0.07756	1.020	1.000 ± 0.054	
	21.53	17.9	3.630	0.08077		1.041		
	22.01	18.23	3.780	0.07280		0.939		
	TXAS	GAPDH						
Uzorak	36.20	18.63	17.57	0.00001	0.00001	1.151	1.538 ± 0.358	0.135
	34.88	17.79	17.088	0.00001		1.607		
	35.61	18.73	16.88	0.00001		1.856		
Kontrola	33.79	16.48	17.31	0.00001	0.00000	1.378	1.000 ± 0.348	
	35.78	17.90	17.88	0.00000		0.928		
	36.53	18.23	18.30	0.00000		0.694		

Tabela 9.125. Uticaj luteolina na ekspresiju *cPLA₂α*, *COX-1*, *COX-2*, *mPGES-1*, *mPGES-2*, *cPGES* i *TXAS* mRNK u LPS-stimulisanim monocitima

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	<i>cPLA₂α</i>	GAPDH				Srednja vrednost	
Uzorak	31.40	15.36	16.04	0.00001	0.00002	0.688	0.731 ± 0.066
	31.33	15.31	16.02	0.00002		0.698	
	31.25	15.44	15.81	0.00002		0.807	
Kontrola	30.06	14.67	15.39	0.00002	0.00002	1.080	1.000 ± 0.072
	29.99	14.46	15.53	0.00002		0.980	
	30.65	15.06	15.59	0.00002		0.940	
	<i>COX-1</i>	GAPDH					
Uzorak	27.99	15.36	12.63	0.00016	0.00015	1.285	1.258 ± 0.089
	28.09	15.31	12.78	0.00014		1.158	
	28.02	15.44	12.58	0.00016		1.330	
Kontrola	27.74	14.67	13.07	0.00012	0.00012	0.947	1.000 ± 0.056
	27.46	14.46	13.00	0.00012		0.994	
	27.97	15.06	12.91	0.00013		1.058	
	<i>COX-2</i>	GAPDH					
Uzorak	32.87	15.36	17.51	0.00001	0.00001	0.314	0.386 ± 0.103
	32.71	15.31	17.4	0.00001		0.339	
	32.27	15.44	16.83	0.00001		0.504	
Kontrola	30.29	14.67	15.62	0.00002	0.00002	1.165	1.000 ± 0.144
	30.40	14.46	15.94	0.00002		0.933	
	31.05	15.06	15.99	0.00002		0.902	
	<i>mPGES-1</i>	GAPDH					
Uzorak	33.35	14.58	18.77	0.00000	0.00000	0.526	0.724 ± 0.280
	32.33	14.37	17.96	0.00000		0.922	
	32.28	14.67	17.61	0.00000	0.00000	1.175	
Kontrola	32.45	14.46	17.99	0.00000		0.903	1.000 ± 0.152
	33.02	15.06	17.96	0.00000		0.922	
	<i>mPGES-2</i>	GAPDH					
Uzorak	20.43	14.58	5.850	0.01734	0.01611	1.717	1.595 ± 0.172
	20.44	14.37	6.070	0.01488		1.474	
	22.35	15.58	6.770	0.00916	0.01010	0.907	
Kontrola	21.45	14.93	6.520	0.01090		1.079	1.000 ± 0.087
	21.13	14.52	6.610	0.01024		1.014	
	<i>cPGES</i>	GAPDH					
Uzorak	37.22	14.43	22.79	0.00000	0.00000	0.309	0.472 ± 0.173
	36.07	14.36	21.71	0.00000		0.652	
	36.72	14.49	22.23	0.00000		0.455	
Kontrola	35.34	14.30	21.04	0.00000	0.00000	1.038	1.000 ± 0.054
	35.15	14.00	21.15	0.00000		0.962	
	37.23	15.10	22.13	0.00000		0.488	
	<i>TXAS</i>	GAPDH					
Uzorak	30.57	14.43	16.14	0.00001	0.00002	0.570	0.646 ± 0.091
	30.11	14.36	15.75	0.00002		0.747	
	30.51	14.49	16.02	0.00002		0.620	
Kontrola	29.85	14.30	15.55	0.00002	0.00002	0.858	1.000 ± 0.145
	29.34	14.00	15.34	0.00002		0.993	
	30.23	15.10	15.13	0.00003		1.149	

Tabela 9.126. Uticaj luteolin-7-O-glukozida na ekspresiju *cPLA₂α*, *COX-1*, *COX-2*, *mPGES-1*, *mPGES-2*, *cPGES* i *TXAS* mRNK u LPS-stimulisanim monocitima

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	P	
	<i>cPLA₂α</i>	GAPDH				Srednja vrednost		
Uzorak	30.01	12.95	17.06	0.00001	0.00001	1.113	1.038 ± 0.107	0.709
	29.72	12.45	17.27	0.00001		0.962		
Kontrola	29.45	12.28	17.17	0.00001	0.00001	1.031	1.000 ± 0.044	
	29.43	12.17	17.26	0.00001		0.969		
	<i>COX-1</i>	GAPDH						
Uzorak	24.77	12.95	11.82	0.00028	0.00017	1.674	1.045 ± 0.195	0.764
	24.66	11.97	12.69	0.00015		0.916		
	24.76	12.45	12.31	0.00020		1.192		
Kontrola	24.78	12.28	12.50	0.00017	0.00017	1.045	1.000 ± 0.06	
	24.80	12.17	12.63	0.00016		0.955		
	<i>COX-2</i>	GAPDH						
Uzorak	33.12	11.97	21.15	0.00000	0.00000	0.431	0.463 ± 0.045	0.007
	33.40	12.45	20.95	0.00000		0.495		
Kontrola	32.26	12.28	19.98	0.00000	0.00000	0.969	1.000 ± 0.044	
	32.06	12.17	19.89	0.00000		1.031		
	<i>mPGES-1</i>	GAPDH						
Uzorak	26.10	12.17	13.93	0.00006	0.00006	1.129	1.041 ± 0.077	0.717
	25.47	11.35	14.12	0.00006		0.990		
	25.49	11.39	14.10	0.00006		1.003		
Kontrola	25.51	11.52	13.99	0.00006	0.00006	1.083	1.000 ± 0.117	
	25.35	11.12	14.23	0.00005		0.917		
	<i>mPGES-2</i>	GAPDH						
Uzorak	19.75	12.17	7.580	0.00523	0.01171	0.474	1.063 ± 0.104	0.547
	17.87	11.35	6.520	0.01090		0.989		
	17.71	11.39	6.320	0.01252		1.136		
Kontrola	17.98	11.52	6.460	0.01136	0.01102	1.031	1.000 ± 0.044	
	17.67	11.12	6.550	0.01067		0.969		
	<i>cPGES</i>	GAPDH						
Uzorak	16.56	12.17	4.390	0.04770	0.10033	0.507	1.066 ± 0.094	0.609
	14.58	11.35	3.230	0.10658		1.133		
	14.80	11.39	3.410	0.09408		1.000		
Kontrola	14.81	11.52	3.290	0.10224	0.09410	1.086	1.000 ± 0.122	
	14.66	11.12	3.540	0.08597		0.914		
	<i>TXAS</i>	GAPDH						
Uzorak	31.25	12.17	19.08	0.00000	0.00001	0.375	1.421 ± 0.345	0.334
	28.28	11.35	16.93	0.00001		1.664		
	28.82	11.39	17.43	0.00001		1.177		
Kontrola	29.19	11.52	17.67	0.00000	0.00000	0.997	1.000 ± 0.005	
	28.78	11.12	17.66	0.00000		1.003		

Tabela 9.127. Uticaj luteolin-7-O-glukuronida na ekspresiju *cPLA₂α*, *COX-1*, *COX-2*, *mPGES-1*, *mPGES-2*, *cPGES* i *TXAS* mRNK u LPS-stimulisanim monocitima

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	P
	<i>cPLA₂α</i>	GAPDH				Srednja vrednost	
Uzorak	32.95	17.57	15.38	0.00002	0.00002	1.213	1.152 ± 0.203
	33.86	18.60	15.26	0.00003		1.318	
	33.08	17.31	15.77	0.00002		0.925	
Kontrola	32.66	16.48	16.18	0.00001	0.00002	0.696	1.000 ± 0.327
	33.13	17.90	15.23	0.00003		1.345	
	33.95	18.23	15.72	0.00002		0.958	
	<i>COX-1</i>	GAPDH					
Uzorak	30.66	17.57	13.09	0.00011	0.00012	0.885	0.933 ± 0.160
	31.83	18.60	13.23	0.00010		0.803	
	30.07	17.31	12.76	0.00014		1.112	
Kontrola	29.40	16.48	12.92	0.00013	0.00013	0.996	1.000 ± 0.080
	30.93	17.90	13.03	0.00012		0.922	
	31.03	18.23	12.80	0.00014		1.082	
	<i>COX-2</i>	GAPDH					
Uzorak	42.39	16.09	26.30	0.00000	0.00000	0.147	0.209 ± 0.064
	43.38	17.56	25.82	0.00000		0.205	
	41.29	15.89	25.40	0.00000		0.274	
Kontrola	38.06	14.9	23.16	0.00000	0.00000	1.296	1.000 ± 0.266
	40.24	16.35	23.89	0.00000		0.781	
	40.69	17.04	23.65	0.00000		0.923	
	<i>mPGES-1</i>	GAPDH					
Uzorak	29.45	17.57	11.88	0.00027	0.00024	1.174	1.073 ± 0.129
	30.82	18.60	12.22	0.00021		0.927	
	29.26	17.31	11.95	0.00025		1.118	
Kontrola	29.34	16.48	12.86	0.00013	0.00023	0.595	1.000 ± 0.351
	29.73	17.9	11.83	0.00027		1.215	
	30.09	18.23	11.86	0.00027		1.190	
	<i>mPGES-2</i>	GAPDH					
Uzorak	25.62	17.57	8.050	0.00377	0.00452	0.550	0.713 ± 0.100
	26.21	18.60	7.610	0.00512		0.746	
	25.05	17.31	7.740	0.00468		0.681	
Kontrola	23.86	16.48	7.380	0.00600	0.00687	0.874	1.000 ± 0.147
	25.14	17.90	7.240	0.00662		0.964	
	25.2	18.23	6.970	0.00798		1.162	
	<i>cPGES</i>	GAPDH					
Uzorak	21.09	17.57	3.520	0.08717	0.08162	1.124	1.052 ± 0.063
	22.25	18.60	3.650	0.07966		1.027	
	20.99	17.31	3.680	0.07802		1.006	
Kontrola	20.14	16.48	3.660	0.07911	0.07756	1.020	1.000 ± 0.054
	21.53	17.9	3.630	0.08077		1.041	
	22.01	18.23	3.780	0.07280		0.939	
	<i>TXAS</i>	GAPDH	0				
Uzorak	35.04	17.57	17.47	0.00001	0.00001	1.233	1.389 ± 0.136
	35.84	18.60	17.24	0.00001		1.446	
	34.51	17.31	17.2	0.00001		1.487	
Kontrola	33.79	16.48	17.31	0.00001	0.00000	1.378	1.000 ± 0.348
	35.78	17.9	17.88	0.00000		0.928	
	36.53	18.23	18.3	0.00000		0.694	

Tabela 9.128. Uticaj epikatehina na ekspresiju *cPLA₂α*, *COX-1*, *COX-2*, *mPGES-1*, *mPGES-2*, *cPGES* i *TXAS* mRNK u LPS-stimulisanim monocitima

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{-ΔCt}	Srednje 2 ^{-ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	p
	<i>cPLA₂α</i>	GAPDH				Srednja vrednost	
Uzorak	30.60	12.25	18.35	0.00000	0.00000	0.839	0.840 ± 0.058
	31.06	12.61	18.45	0.00000		0.783	
	30.56	12.31	18.25	0.00000		0.899	
Kontrola	31.43	12.96	18.47	0.00000	0.00000	0.772	1.000 ± 0.233
	31.02	12.91	18.11	0.00000		0.991	
	34.63	16.84	17.79	0.00000		1.237	
	<i>COX-1</i>	GAPDH					
Uzorak	24.38	12.25	12.13	0.00022	0.00021	0.827	0.766 ± 0.054
	24.89	12.61	12.28	0.00020		0.745	
	24.63	12.31	12.32	0.00020		0.725	
Kontrola	24.82	12.96	11.86	0.00027	0.00027	0.997	1.000 ± 0.045
	24.83	12.91	11.92	0.00026		0.956	
	28.63	16.84	11.79	0.00028		1.047	
	<i>COX-2</i>	GAPDH					
Uzorak	37.35	12.25	25.1	0.00000	0.00000	0.024	0.078 ± 0.048
	35.71	12.61	23.1	0.00000		0.095	
	35.13	12.31	22.82	0.00000		0.116	
Kontrola	32.97	12.96	20.01	0.00000	0.00000	0.811	1.000 ± 0.202
	32.65	12.91	19.74	0.00000		0.978	
	36.27	16.84	19.43	0.00000		1.212	
	<i>mPGES-1</i>	GAPDH					
Uzorak	25.90	11.13	14.77	0.00004	0.00003	1.550	1.435 ± 0.248
	26.33	11.13	15.20	0.00003		1.150	
	25.97	11.25	14.72	0.00004		1.604	
Kontrola	26.70	11.28	15.42	0.00002	0.00002	0.988	1.000 ± 0.053
	26.47	11.15	15.32	0.00002		1.058	
	32.35	16.88	15.47	0.00002		0.954	
	<i>mPGES-2</i>	GAPDH					
Uzorak	17.31	11.13	6.180	0.01379	0.01248	1.382	1.251 ± 0.196
	17.74	11.13	6.610	0.01024		1.026	
	17.47	11.25	6.220	0.01342		1.344	
Kontrola	18.12	11.28	6.840	0.00873	0.00998	0.875	1.000 ± 0.171
	17.54	11.15	6.390	0.01192		1.195	
	23.63	16.88	6.750	0.00929		0.931	
	<i>cPGES</i>	GAPDH					
Uzorak	15.31	11.13	4.180	0.05517	0.05060	1.182	1.084 ± 0.113
	15.61	11.13	4.480	0.04481		0.960	
	15.52	11.25	4.270	0.05183		1.111	
Kontrola	15.84	11.28	4.560	0.04239	0.04667	0.908	1.000 ± 0.203
	15.27	11.15	4.120	0.05751		1.232	
	21.52	16.88	4.640	0.04011		0.859	
	<i>TXAS</i>	GAPDH					
Uzorak	29.00	11.13	17.87	0.00000	0.00000	4.591	4.625 ± 0.561
	29.17	11.13	18.04	0.00000		4.081	
	28.94	11.25	17.69	0.00000		5.201	
Kontrola	31.43	11.28	20.15	0.00000	0.00000	0.945	1.000 ± 0.047
	31.18	11.15	20.03	0.00000		1.027	
	36.91	16.88	20.03	0.00000		1.027	

Tabela 9.129. Uticaj katehina na ekspresiju *cPLA α* , *COX-1*, *COX-2*, *mPGES-1*, *mPGES-2*, *cPGES* i *TXAS* mRNK u LPS-stimulisanim monocitima

	Ct	Ct	Δ Ct	2^{Δ Ct}	Srednje 2^{Δ Ct}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	p
	<i>cPLAα</i>	GAPDH				Srednja vrednost	
Uzorak	36.14	17.91	18.23	0.00000	0.00000	0.912	0.762
	31.04	12.92	18.12	0.00000		0.984	
	30.47	12.32	18.15	0.00000		0.964	
Kontrola	31.43	12.96	18.47	0.00000	0.00000	0.772	1.000 \pm 0.233
	31.02	12.91	18.11	0.00000		0.991	
	34.63	16.84	17.79	0.00000		1.237	
	<i>COX-1</i>	GAPDH					
Uzorak	30.42	17.91	12.51	0.00017	0.00024	0.635	0.906 \pm 0.334
	24.42	12.92	11.50	0.00035		1.280	
	24.49	12.32	12.17	0.00022		0.804	
Kontrola	24.82	12.96	11.86	0.00027	0.00027	0.997	1.000 \pm 0.045
	24.83	12.91	11.92	0.00026		0.956	
	28.63	16.84	11.79	0.00028		1.047	
	<i>COX-2</i>	GAPDH					
Uzorak	39.98	17.91	22.07	0.00000	0.00000	0.194	0.112 \pm 0.085
	37.95	12.92	25.03	0.00000		0.025	
	35.12	12.32	22.80	0.00000		0.117	
Kontrola	32.97	12.96	20.01	0.00000	0.00000	0.811	1.000 \pm 0.202
	32.65	12.91	19.74	0.00000		0.978	
	36.27	16.84	19.43	0.00000		1.212	
	<i>mPGES-1</i>	GAPDH					
Uzorak	36.58	16.86	19.72	0.00000	0.00002	0.050	1.118 \pm 0.115
	26.37	11.23	15.14	0.00003		1.199	
	26.63	11.28	15.35	0.00002		1.037	
Kontrola	26.70	11.28	15.42	0.00002	0.00002	0.988	1.000 \pm 0.053
	26.47	11.15	15.32	0.00002		1.058	
	32.35	16.88	15.47	0.00002		0.954	
	<i>mPGES-2</i>	GAPDH					
Uzorak	23.98	16.86	7.120	0.00719	0.00817	0.720	0.818 \pm 0.161
	18.33	11.23	7.100	0.00729		0.730	
	17.92	11.28	6.640	0.01003		1.005	
Kontrola	18.12	11.28	6.840	0.00873	0.00998	0.875	1.000 \pm 0.171
	17.54	11.15	6.390	0.01192		1.195	
	23.63	16.88	6.750	0.00929		0.931	
	<i>cPGES</i>	GAPDH					
Uzorak	23.71	16.86	6.850	0.00867	0.03404	0.186	1.001 \pm 0.039
	15.69	11.23	4.460	0.04544		0.974	
	15.66	11.28	4.380	0.04803		1.029	
Kontrola	15.84	11.28	4.560	0.04239	0.04667	0.908	1.000 \pm 0.203
	15.27	11.15	4.120	0.05751		1.232	
	21.52	16.88	4.640	0.04011		0.859	
	<i>TXAS</i>	GAPDH					
Uzorak	33.85	16.86	16.99	0.00001	0.00000	8.450	1.822 \pm 0.134
	30.51	11.23	19.28	0.00000		1.728	
	30.41	11.28	19.13	0.00000		1.917	
Kontrola	31.43	11.28	20.15	0.00000	0.00000	0.945	1.000 \pm 0.047
	31.18	11.15	20.03	0.00000		1.027	
	36.91	16.88	20.03	0.00000		1.027	

Tabela 9.130. Uticaj miricetina na ekspresiju *cPLA₂α*, *COX-1*, *COX-2*, *mPGES-1*, *mPGES-2*, *cPGES* i *TXAS* mRNK u LPS-stimulisanim monocitima

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	<i>cPLA₂α</i>	GAPDH				Srednja vrednost	
Uzorak	30.84	12.39	18.45	0.00000	0.00000	0.783	0.789 ± 0.036
	31.03	12.66	18.37	0.00000		0.828	
	31.17	12.67	18.5	0.00000		0.756	
Kontrola	31.43	12.96	18.47	0.00000	0.00000	0.772	1.000 ± 0.233
	31.02	12.91	18.11	0.00000		0.991	
	34.63	16.84	17.79	0.00000		1.237	
	<i>COX-1</i>	GAPDH					
Uzorak	24.80	12.39	12.41	0.00018	0.00022	0.681	0.833 ± 0.136
	24.71	12.66	12.05	0.00024		0.874	
	24.61	12.67	11.94	0.00025		0.943	
Kontrola	24.82	12.96	11.86	0.00027	0.00027	0.997	1.000 ± 0.045
	24.83	12.91	11.92	0.00026		0.956	
	28.63	16.84	11.79	0.00028		1.047	
	<i>COX-2</i>	GAPDH					
Uzorak	35.16	12.39	22.77	0.00000	0.00000	0.120	0.101 ± 0.049
	35.23	12.66	22.57	0.00000		0.137	
	36.84	12.67	24.17	0.00000		0.045	
Kontrola	32.97	12.96	20.01	0.00000	0.00000	0.811	1.000 ± 0.202
	32.65	12.91	19.74	0.00000		0.978	
	36.27	16.84	19.43	0.00000		1.212	
	<i>mPGES-1</i>	GAPDH					
Uzorak	26.30	11.11	15.19	0.00003	0.00003	1.158	1.162 ± 0.121
	26.48	11.14	15.34	0.00002		1.044	
	26.13	11.09	15.04	0.00003		1.285	
Kontrola	26.70	11.28	15.42	0.00002	0.00002	0.988	1.000 ± 0.053
	26.47	11.15	15.32	0.00002		1.058	
	32.35	16.88	15.47	0.00002		0.954	
	<i>mPGES-2</i>	GAPDH					
Uzorak	17.39	11.11	6.28	0.01287	0.01192	1.289	1.194 ± 0.086
	17.62	11.14	6.48	0.01120		1.122	
	17.51	11.09	6.42	0.01168		1.170	
Kontrola	18.12	11.28	6.84	0.00873	0.00998	0.875	1.000 ± 0.171
	17.54	11.15	6.39	0.01192		1.195	
	23.63	16.88	6.75	0.00929		0.931	
	<i>cPGES</i>	GAPDH					
Uzorak	15.45	11.11	4.34	0.04938	0.05230	1.058	1.121 ± 0.090
	15.45	11.14	4.31	0.05042		1.080	
	15.22	11.09	4.13	0.05711		1.224	
Kontrola	15.84	11.28	4.56	0.04239	0.04667	0.908	1.000 ± 0.203
	15.27	11.15	4.12	0.05751		1.232	
	21.52	16.88	4.64	0.04011		0.859	
	<i>TXAS</i>	GAPDH					
Uzorak	29.28	11.11	18.17	0.00000	0.00000	3.729	3.755 ± 0.026
	29.30	11.14	18.16	0.00000		3.755	
	29.24	11.09	18.15	0.00000		3.781	
Kontrola	31.43	11.28	20.15	0.00000	0.00000	0.945	1.000 ± 0.047
	31.18	11.15	20.03	0.00000		1.027	
	36.91	16.88	20.03	0.00000		1.027	

Tabela 9.131. Uticaj floretina na ekspresiju *cPLA2 α* , *COX-1*, *COX-2*, *mPGES-1*, *mPGES-2*, *cPGES* i *TXAS* mRNK u LPS-stimulisanim monocitima

	Ct	Ct	Δ Ct	2^{Δ Ct}	Srednje 2^{Δ Ct}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>	
	<i>cPLA2α</i>	GAPDH				Srednja vrednost		
Uzorak	27.48	11.54	15.94	0.00002	0.00002	1.140	1.098 \pm 0.117	0.283
	27.56	11.68	15.88	0.00002		1.188		
	28.08	11.90	16.18	0.00001		0.965		
Kontrola	27.78	11.58	16.20	0.00001	0.00001	0.952	1.000 \pm 0.043	
	27.58	11.47	16.11	0.00001		1.013		
	27.73	11.65	16.08	0.00001		1.035		
	<i>COX-1</i>	GAPDH						
Uzorak	23.49	11.54	11.95	0.00025	0.00028	0.872	0.955 \pm 0.083	0.544
	23.38	11.68	11.70	0.00030		1.038		
	23.72	11.90	11.82	0.00028		0.955		
Kontrola	23.28	11.58	11.70	0.00030	0.00029	1.038	1.000 \pm 0.085	
	23.37	11.47	11.90	0.00026		0.903		
	23.32	11.65	11.67	0.00031		1.059		
	<i>COX-2</i>	GAPDH						
Uzorak	26.99	11.54	15.45	0.00002	0.00001	1.102	1.047 \pm 0.077	0.569
	27.28	11.68	15.60	0.00002		0.993		
	30.82	11.90	18.92	0.00000				
Kontrola	27.16	11.58	15.58	0.00002	0.00002	1.007	1.000 \pm 0.083	
	26.95	11.47	15.48	0.00002		1.079		
	27.37	11.65	15.72	0.00002		0.914		
	<i>mPGES-1</i>	GAPDH						
Uzorak	29.88	17.09	12.79	0.00014	0.00015	1.507	1.596 \pm 0.181	0.013
	29.37	16.84	12.53	0.00017		1.805		
	31.00	18.18	12.82	0.00014		1.476		
Kontrola	30.37	17.21	13.16	0.00011	0.00009	1.166	1.000 \pm 0.155	
	30.16	16.74	13.42	0.00009		0.974		
	31.48	17.88	13.60	0.00008		0.860		
	<i>mPGES-2</i>	GAPDH						
Uzorak	25.90	17.09	8.810	0.00223	0.00233	1.542	1.612 \pm 0.208	0.018
	25.39	16.84	8.550	0.00267		1.846		
	27.08	18.18	8.900	0.00209		1.448		
Kontrola	26.67	17.21	9.460	0.00142	0.00145	0.982	1.000 \pm 0.160	
	25.95	16.74	9.210	0.00169		1.168		
	37.25	27.58	9.670	0.00123		0.849		
	<i>cPGES</i>	GAPDH						
Uzorak	20.86	17.09	3.770	0.07330	0.06601	1.496	1.347 \pm 0.232	0.112
	20.64	16.84	3.800	0.07179		1.465		
	22.42	18.18	4.240	0.05292		1.080		
Kontrola	21.88	17.21	4.670	0.03928	0.04900	0.802	1.000 \pm 0.173	
	20.98	16.74	4.240	0.05292		1.080		
	21.77	17.58	4.190	0.05479		1.118		
	<i>TXAS</i>	GAPDH						
Uzorak	33.99	17.09	16.90	0.00001	0.00001	0.866	0.728 \pm 0.121	0.076
	34.10	16.84	17.26	0.00001		0.675		
	35.51	18.18	17.33	0.00001		0.643		
Kontrola	34.00	17.21	16.79	0.00001	0.00001	0.935	1.000 \pm 0.153	
	33.20	16.74	16.46	0.00001		1.175		
	33.60	16.74	16.86	0.00001		0.890		

Tabela 9.132. Uticaj pterostilbena na ekspresiju *cPLA₂α*, *COX-1*, *COX-2*, *mPGES-1*, *mPGES-2*, *cPGES* i *TXAS* mRNA u LPS-stimulisanim monocitima

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNA/GAPDH mRNA	<i>p</i>
	<i>cPLA₂α</i>	GAPDH				Srednja vrednost	
Uzorak	28.28	11.67	16.61	0.00001	0.00001	0.717	0.017
	28.09	11.65	16.44	0.00001		0.806	
	28.04	11.24	16.80	0.00001		0.628	
Kontrola	27.78	11.58	16.20	0.00001	0.00001	0.952	1.000 ± 0.043
	27.58	11.47	16.11	0.00001		1.013	
	27.73	11.65	16.08	0.00001		1.035	
	<i>COX-1</i>	GAPDH					
Uzorak	23.87	11.67	12.20	0.00021	0.00022	0.734	0.031
	23.88	11.65	12.23	0.00021		0.719	
	23.19	11.24	11.95	0.00025		0.872	
Kontrola	23.28	11.58	11.70	0.00030	0.00029	1.038	1.000 ± 0.085
	23.37	11.47	11.90	0.00026		0.903	
	23.32	11.65	11.67	0.00031		1.059	
	<i>COX-2</i>	GAPDH					
Uzorak	29.73	11.67	18.06	0.00000	0.00000	0.180	0.000
	29.41	11.65	17.76	0.00000		0.222	
	29.88	11.24	18.64	0.00000		0.121	
Kontrola	27.16	11.58	15.58	0.00002	0.00002	1.007	1.000 ± 0.083
	26.95	11.47	15.48	0.00002		1.079	
	27.37	11.65	15.72	0.00002		0.914	
	<i>mPGES-1</i>	GAPDH					
Uzorak	29.54	17.31	12.23	0.00021	0.00018	2.222	0.012
	30.05	17.50	12.55	0.00017		1.780	
	30.14	17.56	12.58	0.00016		1.743	
Kontrola	30.37	17.21	13.16	0.00011	0.00009	1.166	1.000 ± 0.155
	30.16	16.74	13.42	0.00009		0.974	
	31.48	17.88	13.60	0.00008		0.860	
	<i>mPGES-2</i>	GAPDH					
Uzorak	26.43	17.31	9.120	0.00180	0.00208	1.243	0.032
	26.29	17.50	8.790	0.00226		1.563	
	26.40	17.56	8.840	0.00218		1.510	
Kontrola	26.67	17.21	9.460	0.00142	0.00145	0.982	1.000 ± 0.160
	25.95	16.74	9.210	0.00169		1.168	
	37.25	27.58	9.670	0.00123		0.849	
	<i>cPGES</i>	GAPDH					
Uzorak	21.68	17.31	4.370	0.04836	0.05588	0.987	0.385
	21.43	17.50	3.930	0.06561		1.339	
	21.78	17.56	4.220	0.05366		1.095	
Kontrola	21.88	17.21	4.670	0.03928	0.04900	0.802	1.000 ± 0.173
	20.98	16.74	4.240	0.05292		1.080	
	21.77	17.58	4.190	0.05479		1.118	
	<i>TXAS</i>	GAPDH					
Uzorak	33.96	17.31	16.65	0.00001	0.00001	1.030	0.321
	34.09	17.50	16.59	0.00001		1.074	
	33.73	17.56	16.17	0.00001		1.436	
Kontrola	34.00	17.21	16.79	0.00001	0.00001	0.935	1.000 ± 0.153
	33.20	16.74	16.46	0.00001		1.175	
	33.60	16.74	16.86	0.00001		0.890	

Tabela 9.133. Uticaj rezveratrola na ekspresiju *cPLA₂α*, *COX-1*, *COX-2*, *mPGES-1*, *mPGES-2*, *cPGES* i *TXAS* mRNK u LPS-stimulisanim monocitima

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	p
	<i>cPLA₂α</i>	GAPDH					
Uzorak	30.89	13.08	17.81	0.00000	0.00000	1.220	0.996 ± 0.195
	30.73	12.48	18.25	0.00000		0.899	
	31.02	12.72	18.3	0.00000		0.869	
Kontrola	31.43	12.96	18.47	0.00000	0.00000	0.772	1.000 ± 0.233
	31.02	12.91	18.11	0.00000		0.991	
	34.63	16.84	17.79	0.00000		1.237	
	<i>COX-1</i>	GAPDH					
Uzorak	24.49	13.08	11.41	0.00037	0.00030	1.362	1.116 ± 0.213
	24.37	12.48	11.89	0.00026		0.976	
	24.56	12.72	11.84	0.00027		1.011	
Kontrola	24.82	12.96	11.86	0.00027	0.00027	0.997	1.000 ± 0.045
	24.83	12.91	11.92	0.00026		0.956	
	28.63	16.84	11.79	0.00028		1.047	
	<i>COX-2</i>	GAPDH					
Uzorak	35.24	13.08	22.16	0.00000	0.00000	0.183	0.138 ± 0.039
	35.21	12.48	22.73	0.00000		0.123	
	35.62	12.72	22.9	0.00000		0.109	
Kontrola	32.97	12.96	20.01	0.00000	0.00000	0.811	1.000 ± 0.202
	32.65	12.91	19.74	0.00000		0.978	
	36.27	16.84	19.43	0.00000		1.212	
	<i>mPGES-1</i>	GAPDH					
Uzorak	26.02	11.37	14.65	0.00004	0.00004	1.684	1.712 ± 0.157
	25.37	10.88	14.49	0.00004		1.882	
	26.58	11.83	14.75	0.00004		1.571	
Kontrola	26.70	11.28	15.42	0.00002	0.00002	0.988	1.000 ± 0.053
	26.47	11.15	15.32	0.00002		1.058	
	32.35	16.88	15.47	0.00002		0.954	
	<i>mPGES-2</i>	GAPDH					
Uzorak	18.34	11.37	6.970	0.00798	0.00907	0.799	0.909 ± 0.099
	17.54	10.88	6.660	0.00989		0.991	
	18.57	11.83	6.740	0.00936		0.937	
Kontrola	18.12	11.28	6.840	0.00873	0.00998	0.875	1.000 ± 0.171
	17.54	11.15	6.390	0.01192		1.195	
	23.63	16.88	6.750	0.00929		0.931	
	<i>cPGES</i>	GAPDH					
Uzorak	15.58	11.37	4.210	0.05403	0.04207	1.158	0.901 ± 0.260
	15.44	10.88	4.560	0.04239		0.908	
	16.90	11.83	5.070	0.02977		0.638	
Kontrola	15.84	11.28	4.560	0.04239	0.04667	0.908	1.000 ± 0.203
	15.27	11.15	4.120	0.05751		1.232	
	21.52	16.88	4.640	0.04011		0.859	
	<i>TXAS</i>	GAPDH					
Uzorak	30.44	11.37	19.07	0.00000	0.00000	1.998	1.969 ± 0.118
	30.07	10.88	19.19	0.00000		1.839	
	30.85	11.83	19.02	0.00000		2.069	
Kontrola	31.43	11.28	20.15	0.00000	0.00000	0.945	1.000 ± 0.047
	31.18	11.15	20.03	0.00000		1.027	
	36.91	16.88	20.03	0.00000		1.027	

Tabela 9.134. Uticaj galne kiseline na ekspresiju *cPLA₂α*, *COX-1*, *COX-2*, *mPGES-1*, *mPGES-2*, *cPGES* i *TXAS* mRNK u LPS-stimulisanim monocitima

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	<i>cPLA₂α</i>	GAPDH				Srednja vrednost	
Uzorak	31.02	12.47	18.55	0.00000	0.00000	0.730	0.829 ± 0.153
	30.31	12.22	18.09	0.00000		1.005	
	31.09	12.58	18.51	0.00000		0.751	
Kontrola	31.43	12.96	18.47	0.00000	0.00000	0.772	1.000 ± 0.233
	31.02	12.91	18.11	0.00000		0.991	
	34.63	16.84	17.79	0.00000		1.237	
	<i>COX-1</i>	GAPDH					
Uzorak	24.78	12.47	12.31	0.00020	0.00021	0.730	0.777 ± 0.095
	24.25	12.22	12.03	0.00024		0.886	
	24.92	12.58	12.34	0.00019		0.715	
Kontrola	24.82	12.96	11.86	0.00027	0.00027	0.997	1.000 ± 0.045
	24.83	12.91	11.92	0.00026		0.956	
	28.63	16.84	11.79	0.00028		1.047	
	<i>COX-2</i>	GAPDH					
Uzorak	35.59	12.47	23.12	0.00000	0.00000	0.094	0.167 ± 0.076
	34.57	12.22	22.35	0.00000		0.160	
	34.31	12.58	21.73	0.00000		0.246	
Kontrola	32.97	12.96	20.01	0.00000	0.00000	0.811	1.000 ± 0.202
	32.65	12.91	19.74	0.00000		0.978	
	36.27	16.84	19.43	0.00000		1.212	
	<i>mPGES-1</i>	GAPDH					
Uzorak	26.03	11.03	15	0.00003	0.00003	1.321	1.434 ± 0.150
	25.54	10.82	14.72	0.00004		1.604	
	26.33	11.39	14.94	0.00003		1.377	
Kontrola	26.70	11.28	15.42	0.00002	0.00002	0.988	1.000 ± 0.053
	26.47	11.15	15.32	0.00002		1.058	
	32.35	16.88	15.47	0.00002		0.954	
	<i>mPGES-2</i>	GAPDH					
Uzorak	17.75	11.03	6.72	0.00949	0.01058	0.950	1.060 ± 0.100
	17.35	10.82	6.53	0.01082		1.084	
	17.84	11.39	6.45	0.01144		1.146	
Kontrola	18.12	11.28	6.84	0.00873	0.00998	0.875	1.000 ± 0.171
	17.54	11.15	6.39	0.01192		1.195	
	23.63	16.88	6.75	0.00929		0.931	
	<i>cPGES</i>	GAPDH					
Uzorak	15.59	11.03	4.56	0.04239	0.03497	0.908	0.749 ± 0.138
	15.81	10.82	4.99	0.03147		0.674	
	16.40	11.39	5.01	0.03103		0.665	
Kontrola	15.84	11.28	4.56	0.04239	0.04667	0.908	1.000 ± 0.203
	15.27	11.15	4.12	0.05751		1.232	
	21.52	16.88	4.64	0.04011		0.859	
	<i>TXAS</i>	GAPDH					
Uzorak	30.61	11.03	19.58	0.00000	0.00000	1.403	1.391 ± 0.130
	30.29	10.82	19.47	0.00000		1.515	
	31.13	11.39	19.74	0.00000		1.256	
Kontrola	31.43	11.28	20.15	0.00000	0.00000	0.945	1.000 ± 0.047
	31.18	11.15	20.03	0.00000		1.027	
	36.91	16.88	20.03	0.00000		1.027	

Tabela 9.135. Uticaj hlorogenske kiseline na ekspresiju *cPLA₂α*, *COX-1*, *COX-2*, *mPGES-1*, *mPGES-2*, *cPGES* i *TXAS* mRNK u LPS-stimulisanim monocitima

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>	
	<i>cPLA₂α</i>	GAPDH				Srednja vrednost		
Uzorak	30.00	12.55	17.45	0.00001	0.00001	0.986	0.953 ± 0.047	0.371
	29.88	12.33	17.55	0.00001		0.920		
	30.04	11.99	18.05	0.00000		0.651		
Kontrola	29.94	12.48	17.46	0.00001	0.00001	0.979	1.000 ± 0.029	
	29.70	12.63	17.07	0.00001		1.283		
	29.83	12.43	17.40	0.00001		1.021		
	<i>COX-1</i>	GAPDH						
Uzorak	24.65	12.55	12.10	0.00023	0.00016	1.079	0.735 ± 0.032	0.033
	24.94	12.33	12.61	0.00016		0.757		
	24.69	11.99	12.7	0.00015		0.712		
Kontrola	24.74	12.48	12.26	0.00020	0.00021	0.965	1.000 ± 0.049	
	24.53	12.63	11.90	0.00026		1.240		
	24.59	12.43	12.16	0.00022		1.035		
	<i>COX-2</i>	GAPDH						
Uzorak	32.69	12.55	20.14	0.00000	0.00000	1.568	1.471 ± 0.137	0.099
	32.66	12.33	20.33	0.00000		1.375		
	34.34	11.99	22.35	0.00000		0.340		
Kontrola	37.28	12.48	24.80	0.00000	0.00000	0.060	1.000 ± 0.049	
	33.47	12.63	20.84	0.00000		0.965		
	33.17	12.43	20.74	0.00000		1.035		
	<i>mPGES-1</i>	GAPDH						
Uzorak	27.05	13.49	13.56	0.00008	0.00008	0.832	0.795 ± 0.049	0.013
	27.10	13.37	13.73	0.00007		0.739		
	27.00	13.41	13.59	0.00008		0.815		
Kontrola	26.85	13.52	13.33	0.00010	0.00010	0.976	1.000 ± 0.034	
	26.56	13.56	13.00	0.00012		1.227		
	26.76	13.50	13.26	0.00010		1.024		
	<i>mPGES-2</i>	GAPDH						
Uzorak	19.73	13.49	6.240	0.01323	0.01250	1.075	1.015 ± 0.052	0.795
	19.75	13.37	6.380	0.01201		0.975		
	19.76	13.41	6.350	0.01226		0.996		
Kontrola	19.92	13.52	6.400	0.01184	0.01231	0.962	1.000 ± 0.078	
	19.98	13.56	6.420	0.01168		0.949		
	19.72	13.50	6.220	0.01342		1.090		
	<i>cPGES</i>	GAPDH						
Uzorak	16.68	13.49	3.190	0.10958	0.10237	1.460	1.364 ± 0.085	0.008
	16.69	13.37	3.320	0.10013		1.334		
	16.77	13.41	3.360	0.09740		1.298		
Kontrola	17.11	13.52	3.590	0.08304	0.07506	1.106	1.000 ± 0.095	
	17.41	13.56	3.850	0.06935		0.924		
	17.28	13.50	3.780	0.07280		0.970		
	<i>TXAS</i>	GAPDH						
Uzorak	31.68	13.49	18.19	0.00000	0.00000	0.607	0.633 ± 0.029	0.003
	31.43	13.37	18.06	0.00000		0.664		
	31.55	13.41	18.14	0.00000		0.628		
Kontrola	31.56	13.52	18.04	0.00000	0.00001	0.673	1.000 ± 0.190	
	31.00	13.56	17.44	0.00001		1.021		
	31.00	13.50	17.50	0.00001		0.979		

Tabela 9.137. Uticaj aukubina na ekspresiju cPLA₂α, COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2, cPGES i TXAS mRNK u LPS-stimulisanim monocitima

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	p
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Uzorak	29.82	12.52	17.3	0.00001	0.00000	1.094	0.038
	30.29	12.21	18.08	0.00000		0.637	
	29.96	12.05	17.91	0.00000		0.717	
Kontrola	29.94	12.48	17.46	0.00001	0.00001	0.979	1.000 ± 0.029
	29.70	12.63	17.07	0.00001		1.283	
	29.83	12.43	17.4	0.00001		1.021	
	COX-1	GAPDH					
Uzorak	24.56	12.52	12.04	0.00024	0.00014	1.124	0.019
	24.98	12.21	12.77	0.00014		0.678	
	24.98	12.05	12.93	0.00013		0.607	
Kontrola	24.74	12.48	12.26	0.00020	0.00021	0.965	1.000 ± 0.049
	24.53	12.63	11.90	0.00026		1.24	
	24.59	12.43	12.16	0.00022		1.035	
	COX-2	GAPDH					
Uzorak	32.89	12.52	20.37	0.00000	0.00000	1.337	0.312
	35.02	12.21	22.81	0.00000		0.250	
	32.71	12.05	20.66	0.00000		1.094	
Kontrola	37.28	12.48	24.80	0.00000	0.00000	0.062	1.000 ± .049
	33.47	12.63	20.84	0.00000		0.965	
	33.17	12.43	20.74	0.00000		1.035	
	mPGES-1	GAPDH					
Uzorak	26.82	13.64	13.18	0.00011	0.00010	1.083	0.768
	27.46	14.13	13.33	0.00010		0.976	
	26.67	13.35	13.32	0.00010		0.983	
Kontrola	26.85	13.52	13.33	0.00010	0.00010	0.976	1.000 ± 0.034
	26.56	13.56	13.00	0.00012		1.227	
	26.76	13.50	13.26	0.00010		1.024	
	mPGES-2	GAPDH					
Uzorak	19.63	13.64	5.990	0.01573	0.01499	1.278	0.049
	20.12	14.13	5.990	0.01573		1.278	
	19.56	13.35	6.210	0.01351		1.097	
Kontrola	19.92	13.52	6.400	0.01184	0.01231	0.962	1.000 ± 0.078
	19.98	13.56	6.420	0.01168		0.949	
	19.72	13.50	6.220	0.01342		1.090	
	cPGES	GAPDH					
Uzorak	16.69	13.64	3.050	0.12074	0.10048	1.609	0.122
	17.67	14.13	3.540	0.08597		1.145	
	16.75	13.35	3.400	0.09473		1.262	
Kontrola	17.11	13.52	3.590	0.08304	0.07506	1.106	1.000 ± 0.095
	17.41	13.56	3.850	0.06935		0.924	
	17.28	13.50	3.780	0.07280		0.970	
	TXAS	GAPDH					
Uzorak	31.96	13.64	18.32	0.00000	0.00000	0.555	0.045
	32.98	14.13	18.85	0.00000		0.384	
	31.26	13.35	17.91	0.00000		0.737	
Kontrola	31.56	13.52	18.04	0.00000	0.00001		1.000 ± 0.029
	31.00	13.56	17.44	0.00001		1.021	
	31.00	13.50	17.5	0.00001		0.979	

Tabela 9.138. Uticaj ursolne kiseline na ekspresiju cPLA₂α, COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2, cPGES i TXAS mRNA u LPS-stimuliranim monocitima

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNA/GAPDH mRNA	p	
	cPLA ₂ α	GAPDH						
Uzorak	29.51	13.64	15.87	0.00002	0.00001	2.694	1.377 ± 0.301	0.299
	29.55	12.92	16.63	0.00001		1.591		
	29.48	12.40	17.08	0.00001		1.164		
Kontrola	29.94	12.48	17.46	0.00001	0.00001	0.895	1.000 ± 0.151	
	29.70	12.63	17.07	0.00001		1.172		
	29.83	12.43	17.4	0.00001		0.933		
	COX-1	GAPDH						
Uzorak	24.76	13.64	11.12	0.00045	0.00026	2.127	1.246 ± 0.116	0.166
	24.72	12.92	11.8	0.00028		1.328		
	24.39	12.40	11.99	0.00025		1.164		
Kontrola	24.74	12.48	12.26	0.00020	0.00021	0.965	1.000 ± 0.049	
	24.53	12.63	11.90	0.00026		1.240		
	24.59	12.43	12.16	0.00022		1.035		
	COX-2	GAPDH						
Uzorak	35.06	13.64	21.42	0.00000	0.00000	0.646	0.691 ± 0.064	0.038
	32.71	12.92	19.79	0.00000		1.999		
	33.63	12.40	21.23	0.00000		0.737		
Kontrola	37.28	12.48	24.80	0.00000	0.00000	0.062	1.000 ± 0.049	
	33.47	12.63	20.84	0.00000		0.965		
	33.17	12.43	20.74	0.00000		1.035		
	mPGES-1	GAPDH						
Uzorak	26.48	14.16	12.32	0.00020	0.00018	1.965	1.809 ± 0.169	0.011
	26.42	14.00	12.42	0.00018		1.833		
	26.20	13.61	12.59	0.00016		1.630		
Kontrola	26.85	13.52	13.33	0.00010	0.00010	0.976	1.000 ± 0.034	
	26.56	13.56	13.00	0.00012		1.227		
	26.76	13.50	13.26	0.00010		1.024		
	mPGES-2	GAPDH						
Uzorak	20.46	14.16	6.3	0.01269	0.01399	1.031	1.136 ± 0.098	0.137
	20.05	14.00	6.05	0.01509		1.226		
	19.75	13.61	6.14	0.01418		1.152		
Kontrola	19.92	13.52	6.4	0.01184	0.01231	0.962	1.000 ± 0.078	
	19.98	13.56	6.42	0.01168		0.949		
	19.72	13.50	6.22	0.01342		1.090		
	cPGES	GAPDH						
Uzorak	17.70	14.16	3.54	0.08597	0.09825	1.145	1.309 ± 0.143	0.043
	17.24	14.00	3.24	0.10584		1.410		
	16.89	13.61	3.28	0.10295		1.372		
Kontrola	17.11	13.52	3.59	0.08304	0.07506	1.106	1.000 ± 0.095	
	17.41	13.56	3.85	0.06935		0.924		
	17.28	13.50	3.78	0.07280		0.970		
	TXAS	GAPDH						
Uzorak	32.67	14.16	18.51	0.00000	0.00000	0.486	0.538 ± 0.059	0.002
	32.20	14.00	18.20	0.00000		0.603		
	32.01	13.61	18.40	0.00000		0.525		
Kontrola	31.56	13.52	18.04	0.00000	0.00001	0.673	1.000 ± 0.029	
	31.00	13.56	17.44	0.00001		1.021		
	31.00	13.50	17.5	0.00001		0.979		

Tabela 9.139. PCA analiza glavnih komponenti na osnovu ispoljene aktivnosti odabranih polifenolnih jedinjenja, ursolne kiseline i aukubina u nestimulisanim i LPS-stimulisanim monocitima -doprinos varijabli za 11 glavnih faktora opterećenja (loadigs).

Variable	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Faktor 7	Faktor 8	Faktor 9	Faktor 10	Faktor 11
PGE ₂	-0.747	0.131	-0.362	-0.164	-0.305	-0.327	-0.033	-0.250	0.005	0.052	0.002
TXA ₂	-0.746	0.284	0.377	-0.118	-0.244	-0.312	0.046	0.217	0.017	0.036	-0.017
PGE _{2-s}	-0.797	-0.207	0.271	0.321	-0.016	0.213	0.254	-0.108	0.092	-0.124	-0.011
TXA _{2-s}	-0.372	-0.644	-0.063	0.266	0.470	-0.305	-0.238	-0.009	-0.005	-0.024	-0.013
cPLA _{2á}	-0.209	0.677	0.246	0.531	0.261	-0.284	0.069	0.002	-0.015	-0.043	0.023
COX-1	0.336	0.349	-0.488	0.702	0.052	0.061	0.109	-0.005	0.022	0.127	-0.018
COX-2	0.726	0.307	0.489	0.100	-0.134	-0.051	-0.247	-0.086	0.200	-0.014	-0.006
mPGES-1	-0.284	0.758	-0.486	-0.137	0.043	0.155	-0.201	0.024	-0.051	-0.144	-0.012
mPGES-2	0.628	-0.081	-0.552	-0.310	0.091	-0.332	0.224	0.056	0.140	-0.085	0.000
cPGES	-0.297	0.423	0.207	-0.599	0.543	0.109	0.089	-0.071	0.054	0.094	-0.006
TXAS	-0.843	-0.115	-0.395	0.090	-0.004	0.212	-0.129	0.119	0.183	0.051	0.017
Eigenvalue	3.846	2.002	1.627	1.480	0.768	0.621	0.317	0.152	0.108	0.078	0.002
% Total	34.962	18.202	14.794	13.457	6.978	5.641	2.884	1.377	0.982	0.706	0.017
Cumulative	3.846	5.848	7.475	8.956	9.723	10.34	10.66	10.81	10.92	10.99	11.00
Cumulative	34.96	53.16	67.96	81.41	88.39	94.03	96.92	98.29	99.28	99.98	100.0

Tabela 9.140. Uticaj odabranih polifenolnih jedinjenja i standardnih COX inhibitora na produkciju PGE₂ u LPS-stimulisanim makrofagama

	Radna c μmol/L	Odnos površine pika PGE ₂ i PGB ₂ (PGE ₂ /PGB ₂)			Odnos PGE ₂ /PGB ₂ u radnim probama i kontroli				
		1	2	3	1	2	3	Srednja vrednost	p
Galna k.	25	0.667	0.619	0.621	60.76	56.40	56.52	57.89 ± 0.025	0.011
Kontrola		1.173	1.136	0.984	106.8	103.5	89.67	100.0 ± 9.099	
Kafena k.	25	0.653	0.721	0.901	59.46	65.68	82.04	62.57 ± 4.396	0.009
Kontrola		1.173	1.136	0.984	106.8	103.5	89.67	100.0 ± 9.099	
p-Kumarinska k.	25	0.085	0.081	0.080	75.69	71.62	70.92	72.74 ± 2.877	0.074
Kontrola		0.118	0.108	0.081	104.4	95.63	72.17	100.0 ± 6.179	
Protokatehinska k.	25	0.080	0.053	0.064	70.61	46.78	56.29	51.53 ± 6.726	0.018
Kontrola		0.118	0.108	0.081	104.4	95.63	72.17	100.0 ± 6.179	
Siringinska k.	25	0.100	0.082	0.083	88.40	72.38	73.32	72.85 ± 0.664	0.098
Kontrola		0.118	0.108	0.081	104.4	95.63	72.17	100.0 ± 6.179	
Vanilinska k.	25	0.070	0.079	2.000	61.68	70.14	1771	65.91 ± 5.983	0.030
Kontrola		0.118	0.108	0.081	104.4	95.63	72.17	100.0 ± 6.179	
Epikatehin	25	1.192	1.416	0.356	80.49	95.58	24.05	88.04 ± 10.67	0.462
Kontrola		1.342	0.514	1.658	89.28	34.27	110.7	100.0 ± 15.15	
Katehin	25	0.984	1.078	0.983	89.64	98.16	89.58	89.61 ± 0.049	0.187
Kontrola		1.173	1.136	0.984	106.8	103.5	89.67	100.0 ± 9.099	
Rutin	25	1.251	0.931	1.252	84.46	62.85	84.52	84.49 ± 0.041	0.380
Kontrola		1.342	0.514	1.658	89.28	34.27	110.7	100.0 ± 15.15	
Rezveratrol	25	0.854	0.956	0.958	77.80	87.04	87.28	87.16 ± 0.171	0.134
Kontrola		1.173	1.136	0.984	106.8	103.5	89.67	100.0 ± 9.099	
Aspirin	25	0.753	0.854	0.766	68.56	77.81	69.73	69.15 ± 0.828	0.027
Kontrola		1.173	1.136	0.984	106.8	103.5	89.67	100.0 ± 9.099	
Celekoksib	5	1.057	0.459	0.632	71.35	30.95	42.64	36.80 ± 8.267	0.008
Kontrola		1.342	0.514	1.658	89.28	34.27	110.7	100.0 ± 15.15	
Indometacin	5	1.392	0.775	1.107	93.98	52.33	74.74	63.53 ± 5.848	0.142
Kontrola		1.342	0.514	1.658	89.28	34.27	110.7	100.0 ± 15.15	

Tabela 9.141. Uticaj odabranih polifenolnih jedinjenja i standardnih COX inhibitora na produkciju TXA₂ u LPS-stimulisanim makrofagama

	Radna c μmol/L	Odnos površine pika TXA ₂ i PGB ₂ (TXA ₂ /PGB ₂)			Odnos TXA ₂ /PGB ₂ u radnim probama i kontroli			Srednja vrednost	p
		1	2	3	1	2	3		
Galna k.	25	0.029	0.033	0.026	57.60	65.60	52.46	58.55 ± 5.653	0.005
Kontrola		0.043	0.050	0.050	85.68	99.01	101.0	100.0 ± 1.400	
Kafena k.	25	0.030	0.042	0.033	59.64	83.86	65.50	62.57 ± 4.144	0.031
Kontrola		0.043	0.050	0.050	85.68	99.01	101.0	100.0 ± 1.400	
p-Kumarinska k.	25	0.020	0.080	0.053	61.64	252.4	167.1	114.4 ± 74.54	0.413
kontrola		0.029	0.036	0.029	92.66	114.7	92.63	100.0 ± 12.74	
Protokatehinska k.	25	0.020	0.013	0.026	63.46	42.11	81.10	72.28 ± 12.48	0.120
Kontrola		0.029	0.036	0.029	92.66	114.7	92.63	100.0 ± 12.74	
Siringinska k.	25	0.019	0.026	0.026	59.89	82.44	81.27	81.85 ± 0.831	0.131
Kontrola		0.029	0.036	0.029	92.66	114.7	92.63	100.0 ± 12.74	
Vanilinska k.	25	0.023	0.017		73.47	52.50		62.98 ± 14.83	0.103
Kontrola		0.029	0.036	0.029	92.66	114.7	92.63	100.0 ± 12.74	
Epikatehin	25	0.026	0.039	0.015	96.85	142.9	56.38	76.61 ± 28.62	0.442
Kontrola		0.030	0.020	0.026	108.1	72.37	91.86	90.79 ± 17.91	
Katehin	25	0.022	0.054	0.036	44.04	107.0	72.24	58.14 ± 19.94	0.205
Kontrola		0.043	0.050	0.050	85.68	99.01	101.0	100.0 ± 1.400	
Rutin	25	0.038	0.023	0.025	135.9	83.33	90.02	86.67 ± 4.734	0.325
Kontrola		0.030	0.020	0.026	108.1	72.37	91.86	100.0 ± 11.52	
Rezveratrol	25	0.012	0.015	0.036	24.74	29.95	72.44	27.35 ± 3.682	0.010
Kontrola		0.043	0.050	0.050	85.68	99.01	101.0	100.0 ± 1.400	
Aspirin	25	0.015	0.019	0.014	29.55	38.50	27.64	28.60 ± 1.352	0.001
Kontrola		0.043	0.050	0.050	85.68	99.01	101.0	100.0 ± 1.400	
Celekoksib	5	0.014	0.019	0.015	51.31	67.94	56.20	58.48 ± 8.301	0.011
Kontrola		0.030	0.020	0.026	108.1	72.37	91.86	100.0 ± 17.91	
Indometacin	5	0.028	0.022	0.025	101.6	79.58	90.98	85.28 ± 8.058	0.227
Kontrola		0.030	0.020	0.026	108.1	72.37	91.86	100.0 ± 17.91	

9.6. Upotreba optimizovane metode za ispitivanje anti-inflamatornog potencijala sintetskih jedinjenja

Tabela 9.142. Uticaj odabranih polifenolnih jedinjenja i standardnih COX inhibitora na produkciju PGE₂ u LPS-stimulisanim makrofagama

Uzorak	radna c μmol/L	Odnos površine pika PGE ₂ i PGB ₂ (PGE ₂ /PGB ₂)			Odnos PGE ₂ /PGB ₂ u radnim probama i kontroli				
		1	2	3	1	2	3	Srednja vrednost	
<i>trans-1</i>	50	0.931	0.765	0.916	83.96	69.00	82.62	83.29 ± 0.948	0.155
<i>trans-2</i>	50	0.723	0.923	0.960	65.18	83.20	86.59	84.90 ± 2.404	0.188
3	25	1.073	0.831	1.095	96.74	74.91	98.76	97.75 ± 1.430	0.692
<i>trans-4</i>	50	0.796	0.632	0.813	71.78	56.96	73.31	72.55 ± 1.080	0.050
Kontrola		1.059	0.951	1.158	95.53	85.79	104.5	100.0 ± 6.321	

Tabela 9.143. Uticaj sintetskih jedinjenja i standardnih COX inhibitora na produkciju TXA₂ u LPS-stimulisanim makrofagama

Uzorak	radna c (μM)	Odnos površine pika TXA ₂ i PGB ₂ (TXA ₂ /PGB ₂)			Odnos TXA ₂ /PGB ₂ u radnim probama i kontroli				
		1	2	3	1	2	3	Srednja vrednost	p
<i>trans-1</i>	50	0.037	0.030	0.030	80.37	65.10	65.35	65.22 ± 0.171	0.004
<i>trans-2</i>	50	0.023	0.038	0.036	50.57	82.60	78.61	80.61 ± 2.822	0.001
3	25	0.045	0.022	0.028	99.16	47.05	62.12	54.59 ± 10.65	0.008
<i>trans-4</i>	50	0.015	0.020	0.026	32.03	44.67	56.47	50.57 ± 8.940	0.004
Kontrola		0.038	0.046	0.046	83.26	100.4	99.57	100.0 ± 0.607	

Tabela 9.144. Uticaj jedinjenja trans-1 na ekspresiju cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK u LPS-stimulisanim makrofagama

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	p
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Uzorak	23.91	19.92	3.990	0.06293	0.06442	0.669	0.685 ± 0.017
	23.08	19.12	3.960	0.06426		0.683	
	22.69	18.77	3.920	0.06606		0.702	
Kontrola	23.01	19.59	3.420	0.09343	0.09408	0.993	1.000 ± 0.012
	22.70	19.28	3.420	0.09343		0.993	
	22.29	18.9	3.390	0.09539		1.014	
	COX-1	GAPDH					
Uzorak	26.78	18.77	8.010	0.00388	0.00393	0.634	0.643 ± 0.016
	27.07	19.12	7.950	0.00404		0.661	
	26.78	18.77	8.010	0.00388		0.634	
Kontrola	26.79	19.59	7.200	0.00680	0.00612	1.112	1.000 ± 0.194
	27.00	19.28	7.720	0.00474		0.776	
	26.79	19.59	7.200	0.00680		1.112	
	COX-2	GAPDH					
Uzorak	22.34	19.92	2.420	0.18686	0.26990	0.288	0.417 ± 0.114
	20.88	19.12	1.760	0.29525		0.456	
	20.38	18.77	1.610	0.32760		0.506	
Kontrola	19.43	18.90	0.530	0.69255	0.64792	1.069	1.000 ± 0.119
	20.12	19.28	0.840	0.55864		0.862	
	19.43	18.9	0.530	0.69255		1.069	

Tabela 9.145. Uticaj jedinjenja trans-2 na ekspresiju cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK u LPS-stimulisanim makrofagama

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	p
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Uzorak	22.92	18.40	4.520	0.04359	0.05984	0.463	0.636 ± 0.202
	22.29	18.66	3.630	0.08077		0.859	
	22.84	18.66	4.180	0.05517		0.586	
Kontrola	23.01	19.59	3.420	0.09343	0.09408	0.993	1.000 ± 0.012
	22.70	19.28	3.420	0.09343		0.993	
	22.29	18.9	3.390	0.09539		1.014	
	COX-1	GAPDH					
Uzorak	26.02	18.4	7.620	0.00508	0.00521	0.831	0.852 ± 0.114
	26.43	18.66	7.770	0.00458		0.749	
	26.05	18.66	7.390	0.00596		0.975	
Kontrola	26.79	19.59	7.200	0.00680	0.00612	1.112	1.000 ± 0.194
	27.00	19.28	7.720	0.00474		0.776	
	26.79	19.59	7.200	0.00680		1.112	
	COX-2	GAPDH					
Uzorak	20.26	18.40	1.860	0.27548	0.36078	0.425	0.557 ± 0.126
	19.85	18.66	1.190	0.43830		0.676	
	20.1	18.66	1.440	0.36857		0.569	
Kontrola	19.43	18.90	0.530	0.69255	0.64792	1.069	1.000 ± 0.119
	20.12	19.28	0.840	0.55864		0.862	
	19.43	18.90	0.530	0.69255		1.069	

Tabela 9.146. Uticaj jedinjenja 3 na ekspresiju cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK u LPS-stimulisanim makrofagama

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Uzorak	22.46	18.71	3.750	0.07433	0.07036	0.790	0.748 ± 0.068
	22.94	19.18	3.760	0.07381		0.785	
	22.56	18.57	3.990	0.06293		0.669	
Kontrola	23.01	19.59	3.420	0.09343	0.09408	0.993	1.000 ± 0.012
	22.70	19.28	3.420	0.09343		0.993	
	22.29	18.90	3.390	0.09539		1.014	
	COX-1	GAPDH					
Uzorak	26.89	18.71	8.180	0.00345	0.00342	0.564	0.560 ± 0.103
	27.67	19.18	8.490	0.00278		0.455	
	26.52	18.57	7.950	0.00404		0.661	
Kontrola	26.79	19.59	7.200	0.00680	0.00612	1.112	1.000 ± 0.194
	27.00	19.28	7.720	0.00474		0.776	
	26.79	19.59	7.200	0.00680		1.112	
	COX-2	GAPDH					
Uzorak	20.34	18.71	1.630	0.32309	0.34340	0.499	0.530 ± 0.027
	20.68	19.18	1.500	0.35355		0.546	
	20.07	18.57	1.500	0.35355		0.546	
Kontrola	19.43	18.90	0.530	0.69255	0.64792	1.069	1.000 ± 0.119
	20.12	19.28	0.840	0.55864		0.862	
	19.43	18.90	0.530	0.69255		1.070	

Tabela 9.147. Uticaj jedinjenja trans-4 na ekspresiju cPLA₂α, COX-1 i COX-2 mRNK u LPS-stimulisanim makrofagama

	Ct	Ct	ΔCt	2 ^{ΔCt}	Srednje 2 ^{ΔCt}	Normalizovana vrednost ekspresije enzim mRNK/GAPDH mRNK	<i>p</i>
	cPLA ₂ α	GAPDH				Srednja vrednost	
Uzorak	23.17	18.96	4.210	0.05403	0.05567	0.574	0.592 ± 0.048
	22.88	18.84	4.040	0.06079		0.646	
	23.22	18.96	4.260	0.05219		0.555	
Kontrola	23.01	19.59	3.420	0.09343	0.09408	0.993	1.000 ± 0.012
	22.70	19.28	3.420	0.09343		0.993	
	22.29	18.9	3.390	0.09539		1.014	
	COX-1	GAPDH					
Uzorak	26.76	18.96	7.800	0.00449	0.00437	0.734	0.714 ± 0.018
	26.69	18.84	7.850	0.00433		0.709	
	26.83	18.96	7.870	0.00427		0.699	
Kontrola	26.79	19.59	7.200	0.00680	0.00612	1.112	1.000 ± 0.194
	27.00	19.28	7.720	0.00474		0.776	
	26.79	19.59	7.200	0.00680		1.112	
	COX-2	GAPDH					
Uzorak	21.27	18.96	2.310	0.20166	0.20301	0.311	0.313 ± 0.036
	20.98	18.84	2.140	0.22688		0.350	
	21.43	18.96	2.470	0.18049		0.279	
Kontrola	19.43	18.90	0.530	0.69255	0.64792	1.069	1.000 ± 0.119
	20.12	19.28	0.840	0.55864		0.862	
	19.43	18.90	0.530	0.69255		1.069	