



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Јована Брадић

Испитивање антимикуробних, антиинфламацијских, антиоксидационих и кардиопротективних ефеката екстракта ивањског цвећа, *Galium verum L*

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор: Марина Томовић, доцент

Крагујевац, 2019. године

Сажетак

Циљ овог истраживања био је да испита антимикуробна, антиоксидациона, антиинфламацијска и кардиопротективна својства екстраката добијених из надземних делова биљке ивањско цвеће (*Galium verum L.*). Антимикуробна активност екстраката тестирана је помоћу бујон микродилуционог метода, док је антибиофилм активност тестирана помоћу *Tissue culture plate* теста. Антиинфламациони ефекат екстраката одређиван је на моделу карагенином изазване инфламације код пацова. Овај део студије обухватио је 50 пацова (5 група по 10 пацова): пацови на третману екстрактом у дози од 50 mg/kg, 100 mg/kg и 200 mg/kg интраперитонеално (i.p.), индометацином (10 mg/kg i.p.) и нетретирани пацови. Ефекти екстраката ивањског цвећа на функцију миокарда испитивани су коришћењем модела исхемијско-реперфузионе (И-Р) повреде изолованог срца пацова, методом ретроградне перфузије по *Langendorff*-у. Овај део експеримента обухватио је 80 (8 група по 10 пацова): здрави и спонтано-хипертензивни пацови који су током 4 недеље, пре изазивања срчане И-Р, били на третману метанолним екстрактом ивањског цвећа у дози од 125 mg/kg, 250 mg/kg и 500 mg/kg per os и здрави и спонтано-хипертензивни нетретирани пацови. У узорцима коронарног венског ефлуента одређивани су нивои прооксиданаса, док је из узорцака венске крви одређиван системски редок статус. Наши резултати су открили умерену антибактеријску и слабу антигљивичну активност екстраката, чији је интензитет варирао у зависности од тестираног микроорганизама и типа екстракта. Метанолни екстракт ивањског цвећа у свим дозама показао је значајан потенцијал ка ублажавању инфламације изазване карагенином, при чему је најизраженији ефекат постигнут највишом дозом. Четворонедељни третман екстрактом ивањског цвећа у свим дозама значајно је побољшао опоравак функције миокарда и допринео очувању контракције и релаксације срца, као и одговора коронарне циркулације на исхемију. Такође екстракт ове биљне врсте умањео је срчану и системску продукцију прооксиданаса. Наведене протективне ефекте екстракт ивањског цвећа је остварио у условима нормотензије и повишеног крвног притиска, при чему је интезивнији утицај након администрације више дозе. Обећавајући терапијски потенцијал ивањског цвећа у нашој студији пружа основу за будућа истраживања која би додатно сагледала терапијске могућности ове биљне врсте и расветлила механизме којом остварује протективне биолошке ефекте.

Abstract

The aim of this study was to estimate the antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory and cardioprotective properties of the extracts obtained from the aerial part of lady's bedstraw (*Galium verum* L, *G. verum* L). The antimicrobial activity of the extract was tested by microdilution method, while the antibiofilm activity was assessed by Tissue Culture Plate test. The anti-inflammatory effect of extracts was determined using model of carrageenan induced inflammation in rats. This part of the study included 50 rats (5 groups, 10 rats per group): rats on the treatment with extracts at doses of 50 mg/kg, 100 mg/kg and 200 mg/kg intraperitoneally (i.p.), indomethacin (10 mg/kg i.p.) and untreated rats. The effects of extracts of *G. verum* on myocardial function were investigated by using a model of ischemia-reperfusion (I-R) injury of the isolated rat hearts, by Langendorff retrograde perfusion method. This part of the study included 80 rats divided into 8 groups: healthy and spontaneously hypertensive rats that were treated with methanolic extract of *G. verum* at a dose of 125 mg/kg, 250 mg/kg and 500 mg/kg for 4 weeks prior to the induction of cardiac I-R, and healthy and spontaneously hypertensive untreated rats. Levels of prooxidants were determined in the samples of coronary venous effluent, while systemic redox state was estimated in venous blood samples. Our results revealed a moderate antibacterial and weak antifungal activity of extracts, the intensity of which varied depending on the tested microorganism and the type of extract. Methanolic extract of *G. verum* in all doses showed significant potential to alleviate carrageenan-induced inflammation, with the most pronounced effect achieved with the highest dose. Four-week treatment with *G. verum* extract in all doses significantly improved the myocardial functional recovery and contributed to preservation of contraction and relaxation of the heart, as well as the response of coronary circulation to ischemia. The extract of this plant species diminished the cardiac and systemic production of prooxidants as well. The above-mentioned protective effects of the *G. verum* extract were achieved both in normotension conditions and in conditions of elevated blood pressure, with more intensive influence after administration of higher doses. The promising therapeutical potential of *G. verum* in our study provides a basis for future research that would further explore the therapeutic possibilities of this plant species and illuminate mechanisms underlying protective biological effects.

Садржај

| | | |
|---------|--|----|
| 1. | УВОД..... | 1 |
| 1.1. | Опис врсте <i>Galium verum</i> | 2 |
| 1.2. | Етимологија | 3 |
| 1.3. | Таксономија и распрострањеност <i>Galium verum</i> | 3 |
| 1.4. | Хемијски састав биљне врсте <i>G. verum</i> | 4 |
| 1.4.1. | Полифенолна једињења | 4 |
| 1.4.2. | Иридоиди | 8 |
| 1.4.3. | Остала биоактивна једињења присутна у <i>G. verum</i> | 9 |
| 1.4.4. | Етарско уље ивањског цвећа | 11 |
| 1.5. | Традиционална употреба ивањског цвећа | 12 |
| 1.6. | Фармаколошка активност ивањског цвећа | 13 |
| 1.6.1. | Антиканцерогени ефекти ивањског цвећа | 13 |
| 1.6.2. | Ефекти ивањског цвећа на ендокрини систем | 14 |
| 1.6.3. | Антихемолитичка активност ивањског цвећа..... | 14 |
| 1.6.4. | Холинестеразна активност | 14 |
| 1.6.5. | Антимикробна активност ивањског цвећа | 15 |
| 1.6.6. | Антиоксидациона активност ивањског цвећа | 15 |
| 1.7. | Исхемијска болест срца..... | 17 |
| 1.7.1. | Механизми исхемијско/реперфузионе повреде миокарда..... | 19 |
| 1.7.2. | Феномен прекодиционирања миокарда: улога лековитих биљака..... | 20 |
| 1.8. | Инфламација: улога лековитих биљака | 20 |
| 1.9. | Инфективне болести: улога лековитих биљака | 22 |
| 1.10. | Оксидациони стрес | 23 |
| 1.10.1. | Слободни радикали и редокс равнотежа..... | 23 |
| 1.10.2. | Оксидациони стрес и кардиоваскуларне болести: улога лековитих биљака | 25 |
| 2. | ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА | 27 |
| 2.1. | Општи циљеви..... | 28 |
| 2.2. | Специфични циљеви | 28 |
| 3. | МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД..... | 29 |
| 3.1. | Прикупљање и припрема биљног материјала | 30 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.2. | Припрема екстракта..... | 30 |
| 3.3. | Хемијска карактеризација екстракта..... | 31 |
| 3.3.1. | Скрининг одабраних једињења HPLC-MS/MS техником..... | 31 |
| 3.3.2. | Одређивање укупног фенолног садржаја..... | 32 |
| 3.3.3. | Одређивање укупног флавоноидног садржаја..... | 34 |
| 3.4. | Испитивање способности неутрализације DPPH· радикала екстракта..... | 35 |
| 3.4.1. | Реагенси..... | 36 |
| 3.4.2. | Поступак..... | 36 |
| 3.5. | Испитивање антимикуробне активности екстракта..... | 37 |
| 3.5.1. | Лекови..... | 37 |
| 3.5.2. | Припрема екстракта и хранљиве подлоге..... | 37 |
| 3.5.3. | Испитивани микроорганизми..... | 37 |
| 3.5.4. | Припрема суспензија..... | 38 |
| 3.5.5. | Поступак..... | 39 |
| 3.6. | Испитивање антибиофилм активности екстракта..... | 40 |
| 3.6.1. | Припрема екстракта и хранљиве подлоге..... | 40 |
| 3.6.2. | Испитивани микроорганизми..... | 40 |
| 3.6.3. | Припрема суспензије..... | 40 |
| 3.6.4. | Tissue culture plate (TCP) тест..... | 40 |
| 3.7. | Испитивање антиинфламационе активности екстракта ивањског цвећа..... | 42 |
| 3.7.1. | Експерименталне животиње..... | 42 |
| 3.7.2. | Индукција локалне инфламације и третман екстрактима..... | 42 |
| 3.7.3. | Одређивање антиинфламационе активности екстракта..... | 43 |
| 3.8. | Испитивање кардиопротективних ефеката екстракта ивањског цвећа..... | 43 |
| 3.8.1. | Експерименталне животиње..... | 43 |
| 3.8.2. | Испитивање ex vivo функције срца..... | 45 |
| 3.8.3. | Експериментални протокол..... | 47 |
| 3.9. | Испитивање ефеката ивањског цвећа на системски и срчани редокс статус..... | 48 |
| 3.9.1. | Одређивање индекса липидне пероксидације (мерен као TBARS)..... | 48 |
| 3.9.2. | Одређивање нитрита (NO ₂ ⁻)..... | 50 |
| 3.9.3. | Одређивање супероксид анјон радикала (O ₂ ⁻)..... | 51 |
| 3.9.4. | Одређивање водоник пероксида (H ₂ O ₂)..... | 52 |
| 3.9.5. | Одређивање каталазе (CAT)..... | 54 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 3.9.6. | Одређивање супероксид дисмутазазе (SOD) | 55 |
| 3.9.7. | Одређивање редукованог глутатиона (GSH)..... | 56 |
| 3.10. | Хистопатолошка анализа срца пацова | 57 |
| 3.10.1. | Поступак | 57 |
| 3.11. | Снага студије и величина узорка | 58 |
| 3.12. | Статистичка обрада података..... | 58 |
| 4. | РЕЗУЛТАТИ | 59 |
| 4.1. | Утицај растварача различите поларности на принос екстраката ивањског цвећа..... | 60 |
| 4.2. | Хемијска карактеризација екстраката ивањског цвећа | 60 |
| 4.2.1. | Одабрана једињења у екстрактима ивањског цвећа | 60 |
| 4.2.2. | Садржај укупних фенола и флавоноида у екстрактима | 65 |
| 4.3. | Капацитет неутралисања DPPH· радикала испитиваних екстраката | 65 |
| 4.4. | Антимикробна активност екстраката ивањског цвећа | 66 |
| 4.5. | Антибиофилм активност екстраката ивањског цвећа..... | 70 |
| 4.6. | Антиинфламациона активност екстраката ивањског цвећа | 70 |
| 4.7. | Ефекти екстраката ивањског цвећа на морфометријске карактеристике пацова | 71 |
| 4.7.1. | Ефекти екстраката ивањског цвећа на телесну масу животиња..... | 71 |
| 4.7.2. | Ефекти екстраката ивањског цвећа на масу срца, јетре и бубрега животиња | 72 |
| 4.8. | Ефекти екстраката ивањског цвећа на маркере оксидационог стреса у крви пацова..... | 74 |
| 4.8.1. | Ефекти екстраката ивањског цвећа на системски редокс статус здравих пацова..... | 74 |
| 4.8.2. | Ефекти екстраката ивањског цвећа на системски редокс статус спонтано-хипертензивних пацова..... | 78 |
| 4.8.3. | Разлике у утицају екстраката ивањског цвећа на системски редокс статус здравих и спонтано-хипертензивних животиња | 81 |
| 4.9. | Ефекти екстраката ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова | 84 |
| 4.9.1. | Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока изолованог срца нетретираних пацова..... | 85 |
| 4.9.2. | Ефекти екстраката ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток здравих пацова | 88 |
| 4.9.3. | Ефекти екстраката ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток спонтано-хипертензивних пацова | 99 |
| 4.9.4. | Разлике у ефектима екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток код здравих и спонтано-хипертензивних пацова..... | 110 |

| | |
|--|-----|
| 4.10. Ефекти екстраката ивањског цвећа на маркере оксидационог стреса у перфузату изолованог срца пацова | 114 |
| 4.10.1. Вредности маркера оксидационог стреса у перфузату изолованог срца нетретираних пацова 114 | |
| 4.10.2. Ефекти екстраката ивањског цвећа на маркере оксидационог стреса у перфузату изолованог срца здравих пацова | 116 |
| 4.10.3. Ефекти екстраката ивањског цвећа на маркере оксидационог стреса у перфузату изолованог срца спонтано-хипертензивних пацова | 124 |
| 4.10.4. Разлике у ефектима екстракта ивањског цвећа на срчане прооксидантне маркере код здравих и спонтано-хипертензивних пацова | 132 |
| 4.11. Ефекти екстраката ивањског цвећа на очуваност грађе органа пацова | 136 |
| 4.11.1. Ефекти екстраката ивањског цвећа на очуваност грађе срца здравих пацова након исхемије-реперфузије | 136 |
| 4.11.2. Ефекти екстраката ивањског цвећа на очуваност грађе срца спонтано-хипертензивних пацова након исхемије-реперфузије | 137 |
| 5. ДИСКУСИЈА | 138 |
| 5.1. Хемијски састав екстраката ивањског цвећа | 139 |
| 5.2. Способност неутрализације DPPH радикала екстраката ивањског цвећа | 140 |
| 5.3. Антимикробна активност екстраката ивањског цвећа | 141 |
| 5.4. Антиинфламациона активност екстраката ивањског цвећа | 145 |
| 5.5. Ефекти екстраката ивањског цвећа на системски редокс статус | 148 |
| 5.5.1. Ефекти екстраката ивањског цвећа на системски редокс статус здравих пацова | 148 |
| 5.5.2. Ефекти екстраката ивањског цвећа на системски редокс статус спонтано-хипертензивних пацова | 150 |
| 5.5.3. Разлике у ефектима екстраката ивањског цвећа на системски редокс статус код здравих и хипертензивних пацова | 151 |
| 5.6. Ефекти екстраката ивањског цвећа на ex vivo исхемијско-реперфузиону повреду срца .. | 151 |
| 5.6.1. Утицај примене метанолног екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток пацова | 152 |
| 5.6.2. Утицај примене метанолног екстракта ивањског цвећа на срчани редокс статус | 160 |
| 6. ЗАКЉУЧЦИ | 165 |
| 7. ЛИТЕРАТУРА | 168 |

1. УВОД

1.1. Опис врсте *Galium verum*

Galium verum L. (жуто ивањско цвеће, броћац, богородичин простирач, Иванова трава) је вишегодишња зељаста биљка која припада породици *Rubiacea*. Стабљика ове биљне врсте је усправна, четвороугласта и достиже висину од 60-120 cm. Листови су 1-3 cm дуги и око 2 mm широки, сјајни, тамно зелени, док су на наличју длакави. Цветови су жути и скупљени у велике цвасти, док је плод ситан, црне боје. Надземни делови *G. verum* L. се вековима користе у народној медицини у третману разних обољења. Сакупља се горњи део биљке у цвату, по сувом и сунчаном времену, у периоду од јула до септембра (1-3).

Ивањско цвеће сматра се цвећем дуговечности и здравља. Од давних времена постоји обичај међу Србима да се 7. јула када православни верници прослављају Ивандан прави венац од ивањског цвећа. Народ поставља венац на врата својих домова јер постоји веровање да он штити породицу од несрећа и недаћа.



Слика 1. *Galium verum* - жуто ивањско цвеће

1.2. Етимологија

Назив ове биљке *Galium verum* потиче од грчке речи *gala* што значи млеко и латинске речи *verus* што значи прави. Цветови и листови ивањског цвећа садрже ензиме који доводе до згрушавања млека и зато се од давнина херба ове биљне врсте користи у производњи сира (4, 5). На страним језицима називи ивањског цвећа су: lady's bedstraw, yellow bedstraw (енглески), caille-lait jaune, gaillet vrai, gaillet jaune (француски), suaialeche, galio, presera, sanjuanera (шпански) (6).

1.3. Таксономија и распрострањеност *Galium verum*

Ивањско цвеће припада роду *Galium* који обухвата око 400 биљних врсти, од којих је 145 распрострањено у Европи. У флори Србије јавља се 37 врсти ове биљке, међу којима је жуто ивањско цвеће најпознатије по употреби у традиционалној медицини (1, 2, 7). У табели 1 је приказана таксономија ивањског цвећа (6).

Ивањско цвеће је дан распрострањено у целој Европи, Азији, Северној Америци и Африци. Пореклом је са територије Европе и Азије, али је касније пренето и на остале континенте. На нашим просторима ова биљна врста успева на планинским ливадама и пашњацима (3, 5).

Табела 1. Таксономија *Galium verum* L.

| Таксономске категорије | Таксони |
|------------------------|---------------|
| Царство | Plantae |
| Раздео | Magnoliophyta |
| Класа | Magnoliopsida |
| Ред | Gentianales |
| Фамилија | Rubiaceae |
| Род | Galium |
| Врста | Galium verum |

1.4. Хемијски састав биљне врсте *G. verum*

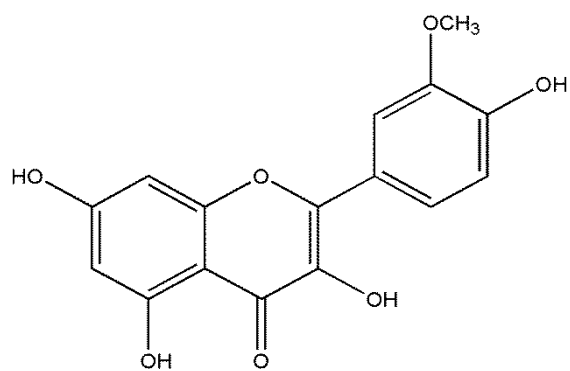
Током протекле две деценије значајни истраживачки напори били су усмерени ка испитивању биљних секундарних метаболита који би допринели унапређењу здравља људи. Супстанце биљног порекла као и екстракти, декокти, чајеви и етарска уља лековитих биљака налазе се фокусу интересовања бројних студија због импозантних биолошких карактеристика (8, 9). Анализе фитохемијског састава *G. verum* указују на присуство различитих фармаколошки активних једињења којима се приписују многобројна лековита својства ове биљне врсте. Надземни део предстаља добар извор иридоидних гликозида, полифенола, антрахинона и тритерпена, док су у мањим количинама заступљени танини, сапонини, алкалоиди, етарска уља, пигменти и витамин Ц (2, 3). Доминантна биоактивна једињења која су и највише изучавана у екстрактима ивањског цвећа су полифеноли и иридоиди.

1.4.1. Полифенолна једињења

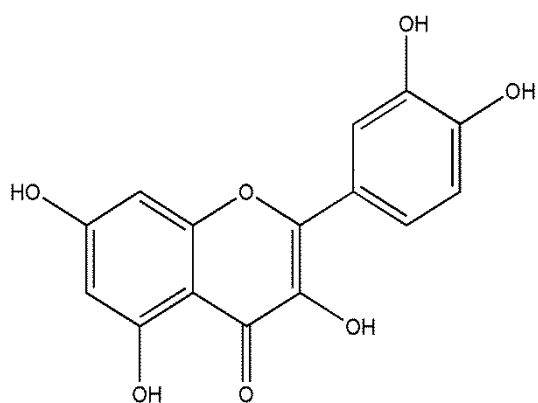
Полифеноли представљају једну од најбројнијих и најзначајнијих група биљних секундарних метаболита, које карактерише заједничко присуство макар једног ароматичног прстена за који су везане једна или више хидроксилних група (10, 11). Биљни полифеноли заступљени су претежно у воћу, поврћу, житарицама, вину итд (12). Досадашњим истраживањима је потврђено присуство неколико стотина различитих полифенолних једињења у јестивим биљкама, која су заслужна за карактеристике намирница као што су горчина, боја, укус и мирис (13, 14). Секундарни метаболити које биљка ствара неопходни су јој за регуларан раст и заштиту од штетних ефеката ултраљубичастог зрачења, као и развоја микроорганизама (14, 15). На основу хемијске структуре полифенолна једињења се могу класификовати у следеће групе: фенолне киселине, флавоноиди, стилбени и лигнани. У оквиру групе флавоноида на основу броја двоструких веза, броја и положаја супституената са кисеоником разликују се: флавоноли, флавоноли, изофлавоноли, флаванони, антоцијани и флаванолни (11).

Фитохемијска истраживања екстраката жутог ивањског цвећа указују на присуство бројних флавоноида, који се налазе како у облику агликона, тако и у облику хетерозидно везаних метаболита. Идентификовани су флавоноли попут изохармнетина, кверцетина, кемферола, као и њихови гликозидно везани облици: изорхамнетин 3-O- α -L-рамнопиранозил-(1-6)- β -D-глукопиранозид и кверцетин-3-O- β -D-глукопиранозид, кверцетин-3-O- β -D-рутинозид (рутин) и кемферол-3-O- β -D-глукопиранозид (астрагалин) (16, 17). Такође надземни део ивањског цвећа представља извор диосметина, хризина и хиспидулина и гликозида диосметина као што су: диосметин 7-O- β -D-глукопиранозид, диосметин 7-O- β -D-ксилопиранозил-(1-6)- β -D-глукопиранозид и диосметин 7-O- α -L-рамнопиранозил-(1-2)-[β -D-ксилопиранозил-(1-6)]- β -D-глукопиранозид (16-19). У овој биљној врсти идентификовани су катехин и епикатехин, као и флаванонски гликозид хесперидин (18). Структуре најзначајнијих флавоноидних једињења приказане су на слици 2. Примери најзаступљенијих фенолних киселина у ивањском цвећу су кумаринска, ферулинска, кафеинска и хлорогена и њихове структуре приказане су на слици 3 (18-21)

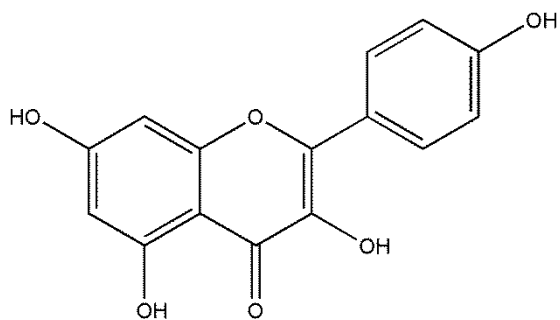
Последњих деценија полифеноли налазе се у жижи научног интересовања захваљујући својим бројним терапеутским својствима. Наиме највећа пажња усмерена је на изучавање антиоксидационих ефеката ових биомолекула које остварују како модулацијом антиоксидационог система заштите тако и директим ефектом „хватања“ слободних радикала (11, 22). Највећи здравствени потенцијал полифенола огледа се у спречавању настанка кардиоваскуларних и малигних болести, дијабетеса, остеопорозе и неуродегенеративних болести (11, 23, 24).



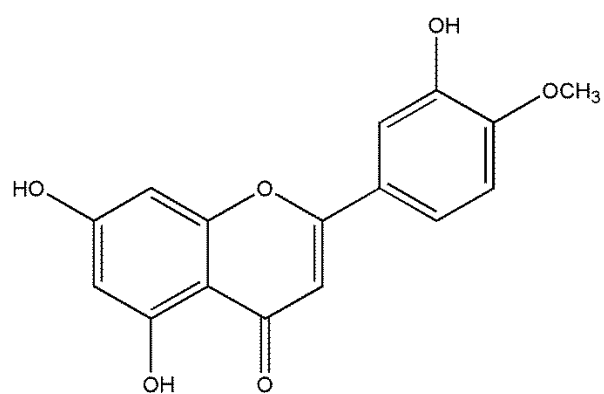
изохармнетин



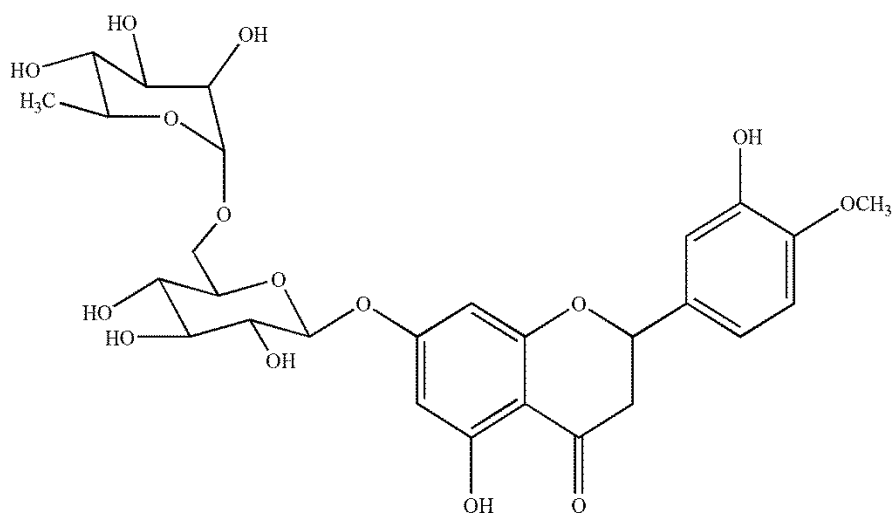
кверцетин



кемферол

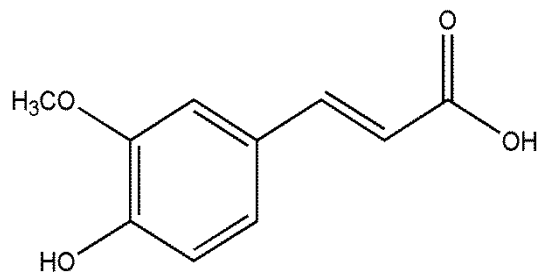


диосметин

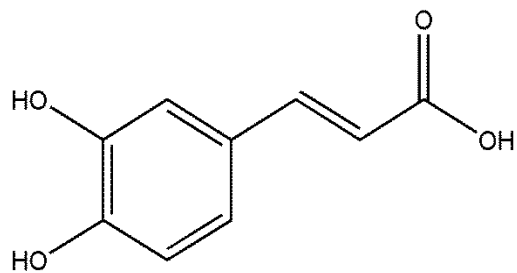


Хесперидин

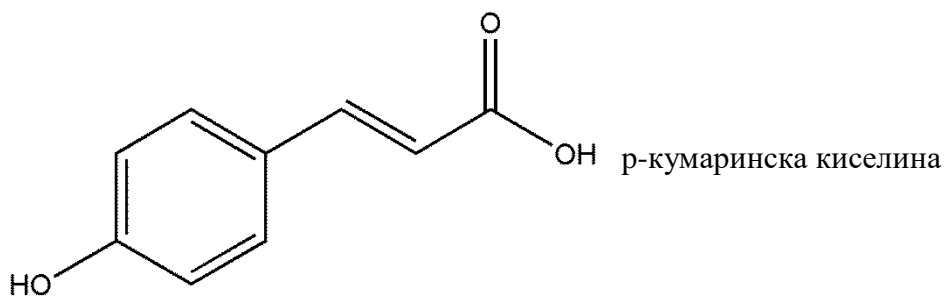
Слика 2. Структуре најзначајнијих флавоноидних једињења изолованих из *G. verum*



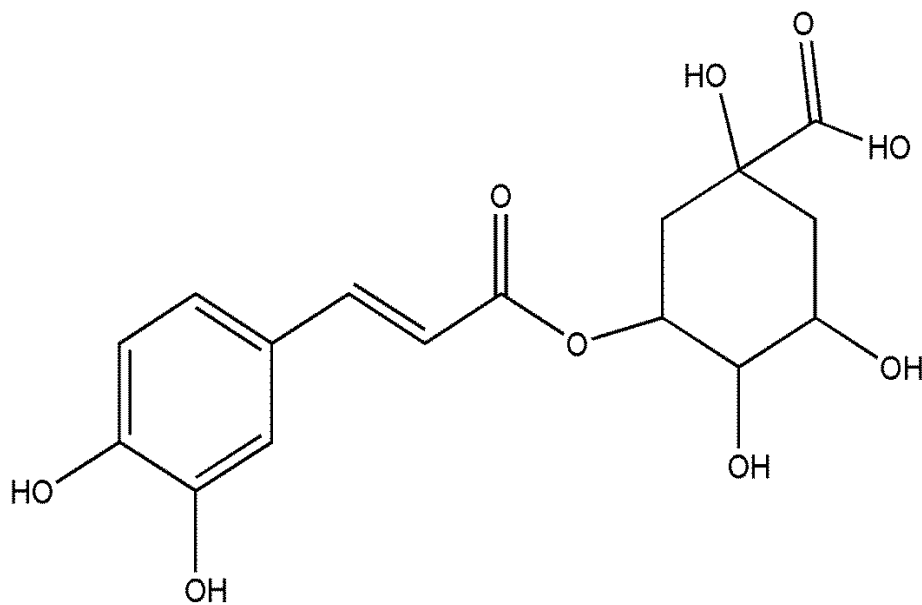
ферулинска киселина



кофеинска киселина



p-кумаринска киселина



хлорогена киселина

Слика 3. Структуре најзначајнијих фенолних киселина изолованих из *G. verum*

1.4.1.1. Фактори који утичу на садржај полифенола у екстракту ивањског цвећа

На садржај полифенола у екстрактима биљака утичу бројни фактора као што су: хемијска структура једињења које се екстрахују, врста екстракције, дужина трајања, примењена температура, поларност растварача, као и подручје са ког је сакупљен биљни материјал (25). Истраживање које је испитивало утицај различитих техника екстракције на садржај полифенола *Galium* врста издваја екстракцију под рефлуксом као погодан метод због повећане растворљивости фенола и флавоноида у екстракционом растварачу при високим температурама (26). Генерално гледано, у процесима екстракције најчешће су као растварачи у употреби вода, ацетон, метанол, етанол итд. Предност воде као растварача огледа се у безбедности, нетоксичности и могућности екстракције флавоноида који испољавају антиоксидационо деловање. С друге стране примена етанолних и метанолних раствора пружа могућност за изоловање веће количине полифенола из биљног материјала, док је метанол нарочито погодан за екстракцију катехина, епикатехина, епигалокатехина. Додатно када се користи ацетон као растварач могуће је екстраховати многе хидросолубилне и липосолубилне компоненте (27, 28).

Међутим недостатак примене воде, метанола и ацетона самостално огледа се у недовољном капацитету за изоловањ полифенола који се у биљци налазе везани за друге биомолекуле попут полисахарида, терпена, хлорофила, липида итд. Уколико су полифеноли везани водоничним везама за протеине, органски растварач неће бити довољан за раскидање везе, већ је пожељна комбинована примена са водом (29).

1.4.2. *Иридоиди*

Доступни подаци указују на богатство биљних врста из рода *Galium* једињењима из групе иридоида (3, 6). Иридоиди представљају неиспарљиве монотрпене који садрже циклопентан-[С]-пирански скелет и присутни су у биљкама и животињама. У биљкама се најчешће јављају везани за глукозу, односно као иридоидни гликозиди (30, 31).

И поред вишевековне примене ивањског цвећа у традиционалној медицини, број истраживања који је испитивао његов хемијски састав је ограничен. Први подаци о заступљености иридоида у надземном делу ивањског цвећа датирају од почетка 80-их

година 20. века. Тада су *Böjthe-Horváth K* и сарадници открили присуство следећих једињења у ивањском цвећу: асперулозид, асперулозидинска киселина, деацетил-асперулозидинска киселина, монотропеин, скандозид и генипозидинску киселину (32, 33). Почетак 21. века представља наставак фитохемијских испитивања ове биљне врсте. Додатно су идентификовани логанин, 6-ацетилскандозид и секогалиозид, 6-о-епи-ацетилскандозид, дафилозид и деацетил-дафилозид у надземном делу ивањског цвећа (7, 34). Група истраживача из Турске је била прва која је 2006. год изоловала и разјаснила структуру 6-О-епи-ацетилскандозида и ацикличних монотерпенских гликозида из ове биљне врсте (34). Такође *Lee* и сарадници су указали на присуство 10-р-дихидрокумароил-6- α -хидроксигенипозида, 10-р-дихидрокумароил деацетиласперулозида и метилестра асперулозидинске киселине у метанолном екстракту ивањског цвећа (35). Структуре најзначајнијих иридоида изолованих из ивањског цвећа приказане су на слици 4.

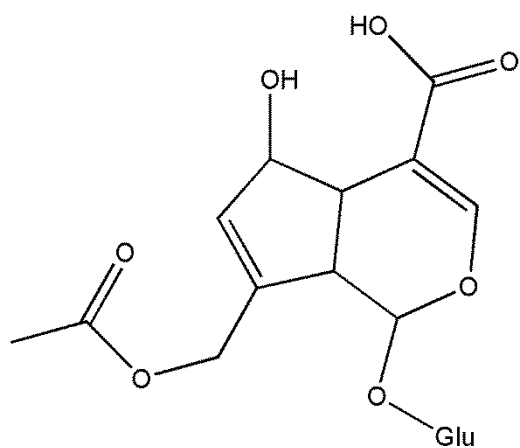
Здравствени бенефити уноса иридоида базирају се на хепатопротекцији, кардиопротекцији, неуропротекцији, као и антиинфламационом, антимицробном и антиоксидационом деловању. Такође иридоиди су ефикасни у снижавању нивоа глукозе и липида у крви што указује на њихову улогу у терапији дијабетеса и кардиоваскуларних болести. Због карактеристичног горког укуса користе се као агенси за побољшање апетита (31, 36).

1.4.3. Остала биоактивна једињења присутна у *G. verum*

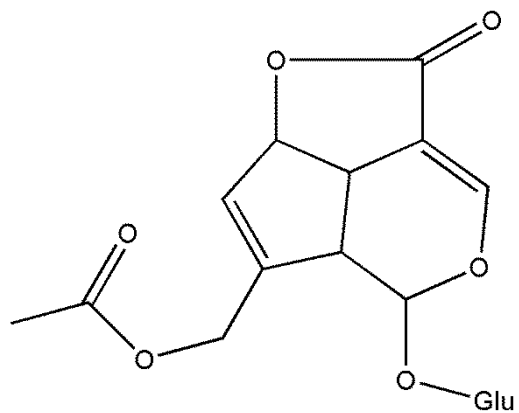
Поред полифенола и иридоида који због квантитативне заступљености највише доприносе ефектима ивањског цвећа, у мањим концентрацијама идентификовани су и монотерпени, антрахинони и фитостероли (3). До данас постоје подаци о присуству 2 монотерпенска гликозида као што су бетулалбузид А и (2E)-2,6-диметил-2,7-октадиен-1,6-диол-6О- β -глукопиранозид у надземном делу ивањског цвећа (34). Из групе антрахинона пронађени су 1,3-дихидрокси-2-метилантрахинон, 2-хидрокси-1,3-диметокси антрахинон и 2,5-дихидрокси-1,3-диметоксиантрахинон (37).

Фитостероли представљају биљна једињења структурно и функционално слична холестеролу (38). Спроведене студије указују на присуство β -ситостерола (85.46 ± 1.24

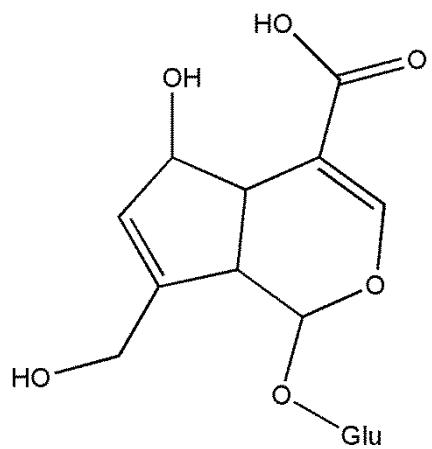
µg/g екстракта) и кемпестерола (9.86 ± 0.04 µg/g екстракта) у надземном делу ивањског цвећа (19).



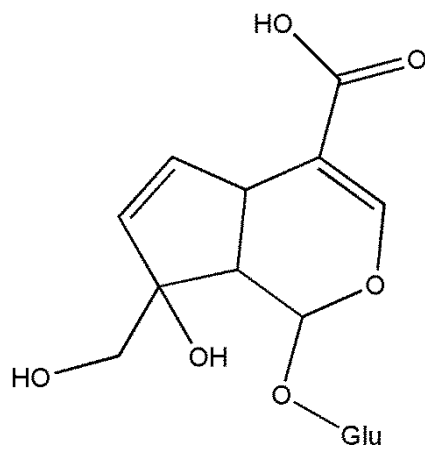
асперулозидинска киселина



асперулозид



деацетиласперулозидинска киселина



монотропеин

Слика 4. Структуре најзначајнијих иридоида изолованих из *G. verum*

1.4.4. Етарско уље ивањског цвећа

Највећи број истраживања који је имао за циљ испитивање хемијског састава ивањског цвећа био је усмерен на екстракте ове биљне врсте, док су подаци о фитохемијским анализама етарског уља ограничени. Доступне информације које се односе на квантитативно-квалитативни састав етарског уља ивањског цвећа приказан је у табели 2.

Табела 2. Преглед резултата студија које су испитивале хемијски састав етарског уља *G. verum*

| Једињење | % у цветовима | референца |
|--|--------------------|-----------|
| цис-3-хексен-1-ол | 0,82 | (39) |
| диетиленгликол монометил етар | 0,28 | |
| бензил алкохол | 0,22 | |
| диоктилфталат | 0,57 | |
| Једињење | % у надземном делу | референца |
| кариофилен | 26 | (40) |
| кариофилен оксид | 16,2 | |
| гермакрен D | 11,2 | |
| фитол | 9,27 | (6) |
| тетрадекан | 11,76 | |
| хексадекан | 12,27 | |
| n-тетрадекан | 17,93 | |
| октадекатриеноична киселина- метил естар | 8,08 | |
| хексадеканска киселина- метил естар | 4,32 | |

Наиме студија која је истраживала етарско уље добијено из цветова ове биљне врсте указује на присуство 9 терпеноида, 5 ароматичних једињења и 4 масне киселине који припадају различитим класама органских једињења. У липофилној фракцији доминирали су цис-3-хексен-1-ол (29.77%), сквален (20.82), диетиленгликоз монометил етар (10.17) и бензил алкохол (7.85). Укупна количина испарљивих једињења износила је 2.74% рачунато по апсолутној маси сувог материјала (39).

1.5. Традиционална употреба ивањског цвећа

Биљне врсте које припадају роду *Galium* користе се у медицинске сврхе од давних дана, при чему се по највећем терапијском потенцијалу убедљиво издваја жуто ивањско цвеће (2). Надземни делови ивањског цвећа се традиционално користе као седативи, што је и потврдила етноботаничка студија о употреби дивљих лековитих биљака са територије Централне Србије (41, 42). Сматра се да су хемијска једињења из групе иридоида попут асперулозида заслужна за седативне ефекте *Galium* врста (43). Ивањско цвеће је познато и по благотворним ефектима у лечењу епилепсије, хистерије, нервозе и фобија (2, 19, 44, 45). Хиспидулин је доказани лиганд за бензодиазепинске рецепторе са антиконвулзивним деловањем и његово присуство у ивањском цвећу први пут је описано 2016. године. Ово једињење заједно другим вредним секундарним метаболитима може бити одговорно за традиционалну употребу ивањског цвећа у третману епилепсије (19, 46).

Постоје подаци о антидиуретском ефекту ивањског цвећа и његовој традиционалној употреби у лечењу пијелитиса и циститиса (19, 41, 44). Такође испољава бенефите и код иритације бешике и бубрега, камена у бубрегу и колика, а може наћи примену и као антидијароик, спазмолитик и у лечењу стомачних тегоба (2, 19, 26, 44, 47). Поред тога, надземни делови ивањског цвећа утичу протективно и на поремећаје јетре, делују и као холеретици и холагози (2, 34). Познато је да се ова биљна врста у Кини користи и за лечење хепатитиса (48).

Када је реч о терапији канцера у традиционалној фитомедицини неизоставна је улога ивањског цвећа. Постоје извештаји о успешном лечењу пацијената са карциномом језика и ларинкса применом чаја ове биљне врсте. Jonathan Hartwells' студија наводи да се ивањско цвеће традиционално користи у Европи и Северној Америци у третману канцерогених улцера и канцера дојке (5, 49).

Литературни подаци који се односе на традиционалну употребу ивањског цвећа за спољашњу примену указују на значај у третману кожных промена, псоријазе и зарастања рана (2, 5, 42). Такође вековима се користи и као дијафоретик и депуратив, а забележени су и позитивни ефекти ове биљне врсте код постојања гихта и реуматских болести (2, 26, 41, 45).

1.6. Фармаколошка активност ивањског цвећа

Жуто ивањско цвеће представља једно од најпроучаванијих представних рода *Galium* (2). Студије које су су испитивале биолошке ефекте ове биљне врсте преодминантно су биле спроведене у земљама Азије. То је донекле и очекивано имајући у виду да је традиционална медицина у много већој мери имплементирана у културу и свакодневни живот народа са наведеног континента у односу на Европу и САД (5, 26). Међутим обим спроведених истраживања је ограничен и још увек недовољан да у потпуности сагледа укупне потенцијале ове биљне врсте у многобројним индикацијама. Досадашња сазнања сведоче о значајним здравственим беневитима уноса ивањског цвећа у третману различитих болести и стања и несумњиво представљају погодно тло за наставак испитивања у овом смеру у будућности.

1.6.1. Антикандерогени ефекти ивањског цвећа

Подстицај за научна испитивања антикандерогеног потенцијала ивањског цвећа лежи у његовој дуготрајној традиционалној употреби у третману малигних обољења. Малобројне спроведене експерименталне студије су указале на улогу ове биљне врсте у лечењу канцера, док података о клиничким студијама из ове области нема. *Zhao* је са сарадницима испитивао диосметин екстрахован из ивањског цвећа са територије Кине на цервикалним ћелијским линијама. Показано је да може да инхибира раст тумора и заштити од тумором индуковане апоптозе тимуса. Такође ова група аутора открила је да етанолни екстракт ивањског цвећа може да инхибира пролиферацију хуманих MCF-7 ћелија канцера дојке и индукује ћелијску смрт апоптозом (50). Додатно декокт ове биљне врсте исполио је инхибиторни ефекат на хемосензитивне и хеморезистентне туморске ћелијске линије ларингеалног карцинома, чиме је оправдао његову конкомитантну употребу у терапији канцера главе и врата (5).

1.6.2. Ефекти ивањског цвећа на ендокрини систем

Мали је број истраживања која се односе на ендокрине ефекте ове биљне врсте. Спроведено је истраживање које је имало за циљ да испита протективни потенцијал водено-алкохолног екстракта ивањског цвећа на структурне промене тироидеје и оваријума код пацова под условима анакинетичког стреса. Резултати овог експеримента показали су да екстракт у дози од 25 mg/100 g т.м. стимулише активност тироидеје и оваријума (51). Такође у другој студији је уочено да у условима анакинетичког стреса администрација исте дозе водено-алкохолног екстракта ивањског цвећа појачава неуросекреторну активност хипоталамичких паравентрикуларних једара. То се може довести у везу са стимулацијом ослобађања коритикотропин-*releasing* хормона, активацијом хормона предњег режња хипофизе, као и стимулацијом адреналних стероидних хормона. Секреторна активност ивањског цвећа је додатно потврђена и хистолошким анализама ткива животиња (43).

1.6.3. Антихемолитичка активност ивањског цвећа

Недавно је спроведено истраживање које је испитивало антихемолитичку активност екстракта биљака с циљем да идентификује могуће кандидате за лечење болести повезаних са хемолизом. Откривено је да екстракт надземног дела ивањског цвећа добијен методом перколације снажно антагонизује хемолизу изазвану реактивним кисеоничним врстама. IC 50 вредност овог екстракта је износила 1,32 µg/mL, што указује на већу потентност у односу на референтни витамин Ц чија IC износи 50 235 ±5.26 µg/mL. Такође је потврђена и антихемолитичка активност метанолног екстракта ивањског цвећа (41).

1.6.4. Холинестеразна активност

Анализом ефеката ивањског цвећа на хуману серумску холинестеразу уочено је да доводи до благе активације (+16.28 ± 0.09 %) у поређењу са референтним агенсом

неостигмин бромидом који је показао инхибицију од $-35,26 \pm 0,12$ %. Овај податак је од интереса јер активација холинестеразе наведеном биљним екстрактом може бити потенцијално опасна у присуству других болести ЦНС-а попут Алцхајмерове болести (41).

1.6.5. Антимикробна активност ивањског цвећа

Иако се врсте из рода *Galium* дуго низ година користе у традиционалној медицини у третману инфективних болести, антимикробна активност ивањског цвећа није у потпуности истражена. Досадашње студије сведоче о антибактеријској активности екстракта ивањског цвећа према различитим сојевима грам позитивних и грам негативних бактерија, док је потенцијал у лечењу гљивичних инфекција ограничен (52-54). Потврђено је да растварач који се користи приликом екстракције биљног материјала доприноси укупном антимикробном потенцијалу екстракта. Резултати претходно спроведеног истраживања указују на израженију антибактеријску активност хлороформског у односу на водени и етанолни екстракт (52). Међутим према нашим сазнањима разлика у антибактеријском и антигљивичном ефекту воденог, метанолног и ацетонског екстракта није позната.

1.6.6. Антиоксидациона активност ивањског цвећа

Постоје докази да биљне врсте које припадају роду *Gallium* поседују антиоксидациона својства. Екстракти надземног дела ивањског цвећа испољавају веома снажну активност „чистача“ слободних радикала која је дозно-зависна. Претходне студије одређивале су антиоксидациони капацитет екстракта ивањског цвећа на основу способности да неутралише 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH) радикал, хидроксил (OH) радикал, водоник пероксид (H_2O_2) и инхибира липидну пероксидацију (табела 3).

Табела 3. Преглед резултата истраживања која су испитивала *in vitro* антиоксидациону активност екстракта ивањског цвећа

| Биљни материјал | Метода | Резултат | Референца |
|---|---|---|-----------|
| <i>Метанолни екстракт надземног дела ивањског цвећа са Златара, Србија</i> | одређивање неутрализације DPPH• | IC 50 = 3,10 µg/ml | (2) |
| | одређивање капацитета хватања OH• | IC 50 = 0,05 µg/ml | |
| | одређивање капацитета хватања H ₂ O ₂ | IC 50 = 4,98 µg/ml | |
| | инхибиција липидне пероксидације | IC 50 = 11, 69 µg/ml | |
| <i>Метанолни екстракт надземног дела ивањског цвећа са Ветерника, Србија</i> | одређивање неутрализације DPPH• | IC 50 = 8,04 µg/ml | (2) |
| | одређивање капацитета хватања OH• | IC 50 = 0,54 µg/ml | |
| | одређивање капацитета хватања H ₂ O ₂ | IC 50 = 3,80 µg/ml | |
| | инхибиција липидне пероксидације | IC 50 = 19,47 µg/m | |
| <i>Етанолни екстракт надземног дела ивањског цвећа из Трансилваније, Румунија</i> | одређивање неутрализације DPPH• | IC 50 = 105,43 ± 0,15 µg/ml | (20) |
| <i>Метанолни екстракт надземног дела ивањског цвећа са места Селичевица и Лалинац, Србија</i> | одређивање неутрализације DPPH• | IC 50 = 26.97±1.21 µg/ml | (41) |
| | одређивање неутрализације ABTS• | 125.14 ±9.98 trolox/ g | |
| | одређивање редокс потенцијала | 70.31 µg/mL | |
| <i>Метанолни екстракт надземног дела ивањског цвећа из Ирана</i> | одређивање неутрализације DPPH• | IC 50 = 59,6 ± 0,04 µg / ml | (55) |
| | одређивање редокс потенцијала | 50-800 µg/ml | |
| | одређивање капацитета хватања NO | IC 50 = 1,7 ± 0,01 µg / ml | |
| | одређивање капацитета хватања H ₂ O ₂ | при конц. од 50 µg/ ml % инхибиције је 92,5 %. | |

Обећавајући резултати спроведених истраживања квалификују ивањско цвећа као могући природни извор антиоксидантних супстанци. Међутим студије које су испитивале потенцијал ивањског цвећа да ублажи оксидциони стрес углавном су примењивале *in vitro* тестове на метанолним, водено-етанолним и етанолним екстрактима. Недавно је спроведена прва студија која је имала за циљ да испита ефекат водено-етанолног екстракта ивањског цвећа на концентрацију прооксиданаса и антиоксиданаса у крви пацова. Показано је да је третман екстрактом ивањског цвећа довео до снижења нивоа индекса липидне пероксидације и повећања активност ензима антиоксидационе заштите у односу на контролне животиње (56). Додатно мали број истраживања имао је за циљ да испита утицај примењеног растварача током процеса екстракције на способност екстракта да неутралише слободне радикале. *Mavi A* и сарадници указали су на највећу антиоксидациону активност метанолног екстракта када се упореди са воденим и алкохолним, који су испољили деловање у опсегу концентрација 50-500 mg/L (57). Такође упоређивањем воденог, 30%, 50% и 70% алкохолног екстракта, уочено је да највећи потенцијал може бити очекиван од 50% алкохолног екстракта. Антиоксидациона активност лековитих биљака приписује се присуству флавоноида, међу којима се истичу по својој ефикасности флавоноли и катехини (58).

1.7. Ишемијска болест срца

Коронарна болест срца (КБС) односно ишемијска болест срца (ИБС) остаје водећи узрок морталитета и инвалидитета широм света, са растућом стопом инциденце (59). Акутни инфаркт миокарда (АИМ) представља озбиљну клиничку манифестацију КБС и карактерише се оклузијом коронарне артерије која доводи до недовољног снабдевања храњљивих материја и кисеоника до срчаног ткива. Услед смањеног дотока кисеоника до срца током ишемије преовладава анаеробни метаболизам који доводи до пада рН вредности и нивоа АТР-а (60). Како би се ублажило накупљање водоникових јона, Na^+/H^+ измењивачка пумпа покушава да екстректује водоникове јоне што узрокује инфлукс натријумових јона (61). Зауоставља се процес оксидативне фосфорилације, смањује стварање АТР-а што доводи до смањене активности АТР-аза. Пад ћелијског АТР-а узрокује смањени ефлукс Ca^{2+} , ограничава се преузимање калцијума од стране

ендоплазматског ретикулума, што у крајњем доводи до преоптерећења Ca^{2+} унутар ћелије. На тај начин се компромитује процес релаксације миокарда. Такође долази до отварања митохондријских транзиционих пора (МТП) што додатно погоршава стварање АТФ-а и доводи до хиперконтрактуре и contracture band necrosis (60, 62).

Најефикаснији терапеутски приступ у смањењу величине инфаркта подразумева рано успостављање поновног протока крви кроз срце. То се постиже благовременом реперфузионом терапијом која може бити механичка, применом перкутане коронарне ангиопластике или фармаколошка, применом тромболитичке терапије (59). Међутим 1960. године *Jennings* и сарадници су уочили да реперфузија може погоршати некрозу срца након исхемије (63). Овај феномен познат је као исхемијско-реперфузиона (И-Р) повреда и описује да повратак кисеоника у исхемични миокард током реперфузије може узроковати пардокасалну дисфункцију кардиомиоцита и продубити оштећење ткива узроковано хипоксичним стресом. Реперфузија може довести и до животно угрожавајућих вентрикуларних аритмија и у крајњем изазвати изненадну срчану смрт. Сматра се да се ефекти КБС углавном приписују штетним последицама И-Р повреде миокарда (60).

Хипертензија се налази међу највећим јавно-здравственим проблемима модерног света са глобалном инциденцом која надмашује 1 билион станованика. Представља главни фактор ризика за настанак АМИ, срчане инсуфицијенције, можданог удара, периферне артеријске болести и анеуризме аорте (64, 65). Већ дуги низ година познато је да су промене у крвном притиску праћене неурохуморалним адаптацијама које утичу на исход И-Р повреде (66, 67). У том смислу одржавање вредности крвног притиска у физиолошким границама представља још већи изазов са систем здравствене заштите. Повећано срчано оптерећење и механички стрес који се јављају у хипертензији могу да модулирају ендogene кардиотоксичне и кардиопротективне механизме. Срце може развити адаптивне механизме за борбу против стреса, али уколико он предуго траје последице се манифестују погоршањем исхода И-Р повреде. Сматра се да је срце преоптерећено притиском склоно штетним последицама И-Р повреде услед смањеног утицаја кардиопротективних путева и повећане активности кардиотоксичних путева (68).

1.7.1. Механизми исхемијско/реперфузионе повреде миокарда

Комплексни механизми укључени у настанак и прогресију И-Р повреде се интензивно испитују више од четири деценије са циљем да се отвори пут ка новим ефикасним стратегијама за спасавање миокарда. Сматра се да су фактори који највише посредују у развоју И-Р повреде: 1) повећана генерација РОС услед увођења молекулског кисеоника, 2) накупљање Ca^{2+} 3) отварање МТП који доводи до ослобађања цитохрома С 4) ендотелна дисфункција 5) изражен инфламацијски одговор (59-62)

Наиме у првим минутима реперфузије долази до појачане продукције про-оксиданаса као што су реактивне кисеоничне (РОС) и реактивне азотне врсте (РНС) које се сматрају кључним иницијаторима И-Р повреде. Сматра се да метаболичке адаптације повезане са исхемијом и измењена хомеостаза митохондрија утичу на повећану продукцију РНС-а у реперфузији. Експресивна концентрација прооксиданаса може надвладати капацитете ендогених антиоксидационих система што резултира оштећењем срца (68-70).

Један од догађаја који се сматра да доприноси дисфункцији срца услед И-Р повреде је отварање митохондријских транзиционих пора (МТП). Наиме током исхемије МТП су затворени, али на почетку реперфузије због присуства веће концентрације РОС и РНС, повећаног нивоа калцијума у митохондријама и повратка рН долази до појачаног отварања МТП. Отварање МТП утиче на ослобађање цитохрома Ц и у крајњем доводи до ћелијске смрти (71-73). Оксидациона оштећења могу утицати на настанак секундарних процеса, као што је проинфламациони одговор (74). Још увек није у потпуности разјашњена улога инфламације у И-Р повреди, односно да ли је инфламациони одговор који прати ИМ одговоран за функционалне и морфолошке карактеристике срца или је пак инфламациони одговор реакција на акутну повреду миокарда (75). Међутим разумевање тачних патофизиолошких механизма укључених у И-Р повреду и даље остаје изазов за клиничаре, а откривање нових алгоритама који би допринели смањењу реперфузионе повреде је и даље предмет расправе у научној заједници.

1.7.2. Феномен прекондиционарања миокарда: улога лековитих биљака

Murry и сарадници су давне 1986. године уочили да излагање срца краткотрајним епизодама исхемије и реперфузије пре дуготрајне исхемије може значајно смањити величину инфаркта (75). Овај маневар је описан као исхемијско прекондиционарање, међутим његова ограничена клиничка примена је ограничена. Из тог разлога истраживачи су усмерени као откривању не-исхемичних, не-хипоксичних агенса, попут биљних производа, који би ублажили штетне ефекте И-Р повреде имитирајући сигнализацију изазвану исхемијским предкондиционарањем (76). Кардиоваскуларни бенефита употребе биљака су познати вековима и заснивају се на њиховом антиагрегационом, хиполипидемијском, антиинфламационом, хипогликемијском и хипотензивном деловању. (77). Резултати бројних истраживања пружају увид у нове терапеутске циљеве и стратегије за лечење И-Р повреде применом различитих биљних врста или препарата добијених из биљака. Сматра да се се наведене терапијске могућности биљних екстраката приписују предоминантно присуству полифенолних једињења (78, 79). Корист од уноса полифенола у снижавању инциденције коронарних болести је научно потврђена (80, 81). Наведена биоактивна једињења могу ублажити штетне утицаје И-Р испољавањем антиоксидационе, антиинфламационе активности и очувањем азот монооксида (81). Током последњих деценија концепт лечења изолованим супстанцама из групе фенола или екстрактима богатим фенолима као природним антиоксидансима је подржан великим бројем студија (82-84). Кардиопротективни ефекти акутне и хроничне примене појединих биљних врста на различитим моделима И-Р су научно потврђени (85-87).

1.8. Инфламација: улога лековитих биљака

Инфламација представља протективни одговор организма на инфекцију, иритацију или присуство страних супстанци који има за циљ да уклони штетне стимулусе као што су патогени, иританси и хемикалије (88). Комплексни механизми који су у основи инфламаторног процеса укључују садејство васкуларног ткива, плазма протеина или ћелија и бројних ћелијских медијатора укључених у иницијацију, пропацију и прогресију запаљења (88-90). Важну улогу у процесу инфламације заузимају хемијски медијатори које

чине протеини плазме или медијатори који потичу из ћелије попут маст ћелија, неутрофила, тромбоцита, моноцита и макрофага. Наведени медијатори специфичним везивањем за рецепторе индукују васкуларну пропустљивост, хемотаксу неутрофила, контракцију глатких мишића и ензимску активацију (91). Велики је значај хемијских медијатора као што су азот-моноксид, простагландини, хистамин, леукотриени и бројни цитокини (92, 93). Главне манифестације инфламације су настанак едема, гранулома и инфилтрација леукоцита (90). Здравствени проблем данашњице представља хронична инфламација која лежи у основи рематоидног артритиса, инфламаторних болести црева, кардиоваскуларних, малигних, неуродегенеративних болести итд. Систем комплементарне и алтернативне медицине отвара многобројне могућности за ефикасно лечење велике популације са инфламаторним болестима (94-96). Тренутна терапија запаљенског процеса базира се на примени стероидних и нестероидних антиинфламаторних лекова (НСАИЛ), чији је главни недостатак појава бројних нежељених ефеката. Прилив информација о нежељеним ефектима синтетских антиинфламаторних лекова знатно повећава интересовање за открићем мање токсичне, а потентне терапијске алтернативе (89). Иазов за научну јавност представља потрага за новим агенсима са другачијим механизмом деловања који би држали процес инфламације под контролом. Истраживања спроведена током последња два века указују на то да биљке представљају драгоцен и бескрајан извор различитих биолошки активних молекула са антиинфламацијским карактеристикама (97, 98). Екстракцијом биљног материјала растварачима различите поларности могуће је изоловати једињења из групе танина, алкалоида, терпена, флавоноида. Међутим највише је проучаван антиинфламациони потенцијал флавоноида, који је документован бројним претклиничким и клиничким студијама (99, 100). Додатна испитивања биљних врста које се традиционално користе у третману инфламације представља логичну истраживачку стратегију у циљу проналаска нових антиинфламационих лекова.

1.9. Инфективне болести: улога лековитих биљака

Велики јавно-здравствени проблем представља растућа учесталост у заједници стечених и болничких инфекција услед развоја мултирезистентних патогена отпорних на доступну антибиотску терапију (101). Заједнички напори владе и академских институција неопходни су за борбу против глобалног ширења патогена отпорних на више антимикуробних лекова, а нарочито у земљама у развоју где су заразне болести узрок половине смртних случајева (102, 103). Поред микроорганизама који се у природи јављају као планктонски организми, односно индивидуалне станице, велику опасност по људско здравље представља и појава биофилма. Биофилм се дефинише као заједница бактерија уклопљених у матрикс које су саме створиле и карактерише их измењен фенотип за разлику од планктонских микроорганизама. и висок степен резистенције на антимикуробне лекове (104). Према Националном институту здравља, за више од 75% инфекција које настају у организму одговорна је сесилна заједница- биофилм. Такође о значају проблема бактеријске резистенције сведочи извештај да у Еворпи годишње умре 25. 000 људи због развоја инфекција према којима доступни лекови нису били ефикасни (105).

Растућа инциденца инфективних болести удружена са настанком бактеријске резистенције, као и озбиљни нежељени ефекти доступних антимикуробних лекова указују на хитну потребу за развојем нових, мање штетних супстанци активних против различитих сојева микроорганизама. Многе биљне врсте користе се од давних дана као антимикуробна терапија, а њихова употреба као зачина може спречити развој микроорганизама и последично кварење намирница (106, 107). Традиционална примена лековитих биљака у третману инфективних болести оправдана је позитивним резултатима бројних истраживања. Ефикасност како екстраката биљака, тако и појединих биљних секундарних метаболита, научно је потврђена и данас се сматра да лековите биљке представљају вредан извор антимикуробних агенаса (108). Из тог разлога биљни екстракти и једињења изолована из биљака налазе се у фокусу интензивних истраживања у циљу детаљног проучавања њиховог директног и индиректног антимикуробног деловања. Бројне *in vitro* студије су показале да су за антимикуробно деловање биљака међу фитохемикалијама најзаслужнији алкалоиди, танини, терпеноиди и полифеноли (109, 110). Будући да нема података о

антиинфламационој активности ивањског цвећа, од великог значаја би било испитати потенцијал екстракта наведене биљне врсте да ублажи запаљенски одговор организма.

1.10. Оксидациони стрес

1.10.1. Слободни радикали и редокс равнотежа

Слободни радикали представљају молекуле, атоме или јоне који садрже неспарени електрон у атомској орбитали и због тога су нестабилни и јако реактивни (111). Они могу да донирају електрон или да га прихвате, па се на тај начин могу понашати и као оксидациона и као редукциона средства (111, 112). Стварају се током нормалних ћелијских метаболичких реакција и као резултат излагања спољашњим факторима попут цигарета, загађивача из ваздуха и индустрије, X-зрака (113). Када су присутни у организму у ниским концентрацијама имају улогу у ћелијској и митохондријалној сигнализацији и функционалности. Међутим у високим концентрацијама прооксиданси модификују ћелијске компоненте доводећи до оштећења и нарушавања хомеостазе (114, 115). Због своје изузетне реактивности прооксиданси могу ступити у реакције са свим молекулима у организму, али главни таргети су свакако липиди, протеини и ДНК (112). У биолошким системима прооксиданси/оксиданси припадају највећим делом реактивним врстама кисеоника (енгл. *Reactive Oxygen Species* - ROS) и реактивним врстама азота (енгл. *Reactive Nitrogen Species* - RNS). У оквиру ROS и RNS издвајају се радикалске и нерадикалске врсте и приказане су у табели 2. Од значаја су још и реактивне врсте сумпора (енгл. *reactive sulfur species* - RSS) и реактивне врсте угљеника (енгл. *reactive carbon species* - RCS) (115).

Табела 4. Приказ најзначајнијих оксиданаса у биолошким системима

| Реактивне врсте кисеоника | | | |
|----------------------------------|----------------|---------------------|--------------|
| Радикалске врсте | | Нерадикалске врсте | |
| Оксидант | Формула | Оксидант | Формула |
| Супероксид анјон радикал | O_2^- | Водоник пероксид | H_2O_2 |
| Хидроксил радикал | OH^\bullet | Хидроксил радикал | OH^\bullet |
| Пероксил радикал | ROO^\bullet | Хипохлорна киселина | $HOCl$ |
| Алкоксил радикал | RO^\bullet | Озон | O_3 |
| Хидропероксил радикал | HOO^\bullet | | |
| Реактивне врсте азота | | | |
| Радикалске врсте | | Нерадикалске врсте | |
| Оксидант | Формула | Оксидант | Формула |
| Азот-моноксид | NO^\bullet | Пероксинитрит анјон | $OONO^-$ |
| Азот-диоксид радикал | NO_2^\bullet | Алkil пероксинитрит | $ROONO$ |

Аеробни организми су развили систем антиоксидационе заштите који има за циљ да неутралише штетне ефекте прооксиданаса и обухвата ензимске и неензимске компоненте.

Табела 5. Приказ најзначајнијих антиоксиданаса у биолошким системима

| Ендогени антиоксиданси | |
|-------------------------------|---------------------|
| Ензимски | Не-ензимски |
| Супероксид дизмутаза- SOD | β -каротен |
| Каталаза- CAT | Витамин Ц |
| Глутатион пероксидаза- GPx | Глутатион- GSH |
| Глутатион редуктаза- GR | α -токоферол |

Антиоксиданси који учествују у примарној заштити организма су SOD, CAT, GR, GPx, GSH. SOD је ензим задужен за дисмутацију реактивне врсте кисеоника O_2^- која је настала редукцијом молекулског кисеоника једним електроном. Под утицајем SOD из O_2^- настаје H_2O_2 , који може под дејством CAT бити потпуно редукован до воде и кисеоника. С друге стране H_2O_2 може бити делимично редукован до јако токсичног хидроксил радикала - OH^\bullet . У реакцији O_2^- са азот моноксидом NO^\bullet може најстати један од најтоксичнијих прооксиданаса пероксинитрит - $OONO^-$ (111-114). У редукцији H_2O_2 на два молекула воде и липидних хидропероксида на липидне алкоhole учествује GSH-Px у

присуству редукованог глутатиона – GSH. У тој реакцији настаје и оксидовани глутатион који се под утицајем ензима глутатион редуктазе (GR) враћа у редуковано стање (116).

1.10.2. Оксидациони стрес и кардиоваскуларне болести: улога лековитих биљака

Оксидациони стрес се дефинише као поремећај равнотеже између прооксиданата и антиоксиданата, као последица последица смањене антиоксидационе заштите или повећане продукције слободних радикала (112). Велики број истраживања сведочи о повезаности оксидационог стреса и развоја кардиоваскуларних болести. Повећана генерација РОС дешава се због нарушене редукције молекулског кисеоника на нивоу митохондрија, секреције РОС од стране леукоцита, ендотелне дисфункције, аутооксидације катехоламина, излагања радијацији или загађењу из ваздуха. Такође услед исцрпљености и/ или измена у експресији гена може доћи до смањења капацитета антиоксидационог система заштите који је кључни фактор у одбрани срчаног и васкуларних мишића (112, 117).

. Иако узрочно-последична веза између оксидационог стреса и развоја КВБ и даље није у потпуности разјашњена, јасни докази иду у прилог томе да је појачано стварање про-оксиданаса присутно у широком спектру експерименталних и клиничких стања (117). Прекомерна концентрација прооксиданса утиче на оштећење макромолекула и нарушавања сигнализације васкуларног зида који је завистан од редокс равнотеже. Такође накупљање ROS нарушава хомеостазу калцијума, што се манифестује настанком аритмија и започињањем срчаног ремоделовања (118). Недавно је постављена хипотеза да је оксидациони стрес кључни играч у патогенези хипертензије. Сматра се да је код повишеног крвног притиска смањена искористљивост азот монооксида као потентног вазодилататора и за то је заслужан делимично супероксид анјон радикал. Такође у хипертензивним условима смањена је активност ензима антиоксидационе заштите попут каталазе и супероксид дизмутате и нижи нивои „хватача“ слободних радикала као што су глутатион, витамини Е и Ц.

Бројни извештаји су потврдили да у реперфузији повратак кисеоника у у кисеоником дефицитарно ткиво узрокује скок у генерисању РОС. Главни извори про-оксиданаса укључују митохондријали респираторни електронски транспортни ланац,

активацију ксантин оксидазе што резултира продукцијом високореактивних O_2^- и H_2O_2 (119).

Последњих година научна интересовања окренута су ка примени лековитих биљака или једињења изолованих из биљака у заштити миокарда од И-Р повреде превасходно због свог потентног антиоксидационог ефекта. Прилив информација које се односе на антиоксидансе природног порекла указују на њихову протективну улогу у превенцији и терапији хипертензије као главног фактора ризика за АИМ. Такође њихова примена побољшава функционални опоравак срца и смањује величину инфаркта, указујући на потенцијално нови терапијски алгоритам базиран на полифенолима у третману инфаркта миокарда (120).

Обзиром на ограничен број студија које су испитивале фармаколошку активност ивањског цвећа, остаје непозаница да ли екстракт ове биљне врсте може испољити анмикробна и антиинфламаторна својства. Такође од интереса је испитати да ли терапија екстрактом ивањског цвећа може ублажити функционалне и морфолошке промене срца изазване И-Р.

2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

На основу свега претходно изложеног циљеви наше студије су били следећи:

2.1. Општи циљеви:

1. Евалуација и компарација антимикуробних ефеката примењених доза екстракта ивањског цвећа.
2. Евалуација и компарација антиинфламацијских ефеката примењених доза екстракта ивањског цвећа.
3. Евалуација и компарација ефеката хроничне администрације примењених доза екстракта ивањског цвећа у моделу прекондиционарања на функционисање миокарда и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.

2.2. Специфични циљеви:

1. Хемијска карактеризација и испитивање способности неутрализације DPPH· радикала екстракта.
2. Испитивање утицаја различитих биомаркера оксидационог оштећења: супероксид анион радикала (O_2^-), нитрита (NO_2^-), индекса липидне пероксидације (мерен као TBARS) и водоник пероксида (H_2O_2) на кардиодинамске параметре срчаног рада и коронарну циркулацију при примени различитих доза екстракта.
3. Евалуација и компарација вредности маркера оксидационог оштећења и анитоксидационе заштите из крви животиња које су претходно биле изложене третману различитим дозама екстракта ивањског цвећа.
4. Стандардним хистолошким методама испитати и упоредити морфолошке промене миокарда настала након исхемије код животиња које су претходно биле изложене третману различитим дозама екстракта ивањског цвећа.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

Ова је експериментална студија на микроорганизмима *in vitro* и на материјалу анималног порекла *in vivo* и *ex vivo*. При експерименталном раду су поштоване одредбе прописаних аката (*EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes* 86/609/ЕЕС) и принципа етичности. Експериментални протокол је одобрен од стране Етичког одбора за добробит експерименталних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

3.1. Прикупљање и припрема биљног материјала

Биљни материјал је сакупљен у јулу 2017. на подручју села Доброселица, општина Чајетина у Златиборском округу. Идентификацију биљног материјала извршила је Снежана Бранковић, доцент департамана за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу. Узорци су депоновани у хербаријуму ботаничке баште Јевремовац под бројем ваучера 17417. Биљни материјал је осушен у хладу на промајном месту и до припреме екстракта чувао се у папирним кесама.

3.2. Припрема екстракта

Надземни део ивањског цвећа уситњен је до степена грубог прашка (2–6 mm) помоћу млина. Коришћен је метода под рефлуксом, која подразумева екстракцију на температури кључања растварача. Метанолни, водени и ацетонски екстракти припремљени су екстраховањем 100 g надземног дела биљке са 500 ml одговарајућег растварача. Смеша је филтрирана кроз филтер папир (Whatman, No.1) и суви екстракт је добијен након уклањања растварача методом упаравања под сниженим притиском помоћу помоћ ротационог вакуум упаривача. Након тога суви екстракти су чувани у тамним стакленим бочицама на +4°C до употребе за даља испитивања (121).

3.3. Хемијска карактеризација екстраката

3.3.1. *Скрининг одабраних једињења HPLC-MS/MS техником*

3.3.1.1. Реагенси

Реагенси који су коришћени за скрининг одабраних фенолних једињења HPLC-MS/MS техником су : метанол, HPLC gradient grade (J. T. Baker, Deventer, The Netherlands), хексан, р.а. (J. T. Baker, Deventer, The Netherlands), мравља киселина, р.а. (Merck, Darmstadt, Germany) и референтни стандарди (Sigma-Aldrich).

3.3.1.2. Поступак

Раздвајање и идентификација одабраних једињења у екстрактима ивањског цвећа извршени су техником течне хроматографије помоћу Agilent Technologies 1200 HPLC-DAD куплованим са Agilent Technologies 6410A ESI-QqQ-MS/MS. Припрема екстраката за анализу спроведена је првобитним растварањем у диметилсулфоксиду и даљим разблаживањем коришћењем 50 % метанола. Добијене су концентрације екстраката од 2%, 0,2 % и 0,02 % које су након филтрирања (филтер од регенерисане целулозе, промера 0,45 μm) анализирани на LC-DAD-MS/MS. Како би се одредио квантитативни и квалитативни састав екстраката, односно утврдили концентрације одабраних фенолних једињења у екстракту, коришћена је претходно утврђена метода (122). Коришћено је по 5 μl узорка сваког од тестираних екстраката. Непокретну фазу представљала је Zorbax Eclipse XDB-C18 колона (50 mm \times 4,6 mm, величина честица 1,8 μm), а температура колоне је одржавана на 50°C током анализе. Мобилну фазу чинио је систем растварача: А- 0,05% водени раствор мравље киселине и В- метанол. Проток мобилне фазе износио је 1,0 ml/min. Примењен је следећи линеарни градијент: 0 min 30 % В, 6 min 70 %, 9 min 100 %, 12 min 100 %, при чему је време ре-еквилибрације износило 3 минута.

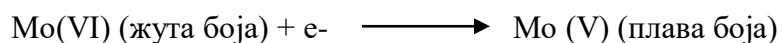
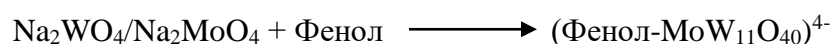
Идентификација одабраних биљних секундарних метаболита извршена је поређењем спектара и ретенционог времена супстанце са спектром и ретенционим

временом стандарда. Потврда идентификације одабраних једињења вршена је праћењем UV/VIS сигнала у опсегу 190–700 nm након чега је ефлуенс прослеђен на MS/MS детектор. Коришћени су следећи параметри јонског извора: притисак небулајзера 50 psi, температура и проток гаса за сушење (N₂) 350 °C и 10 l/min, напон на капилари 4000 V, негативни поларитет. Једињења су праћена у режиму одабране реакције фрагментације (SRM-*selected reactions monitoring*).

Како би се квантификовала испитивана једињења у екстракту примењена је метода екстерног стандарда. Почетни раствор масене концентрације 1,0 mg/ml направљен је за сваки коришћени стандард, а након тога је разблажењем у односу 1:1 направљена серија раствора масене концентрације 1,53 ng/ml - 25,0 µg/ml. Конструисањем калибрационе криве за сваки стандард одређена је масена концентрација одабраних биомолекула у тестираним екстрактима. За читавање површине пикова из хроматограма коришћен је MassHunter Workstation Qualitative Analysis софтвер, верзија B.06.00 (Agilent Technologies), док су калибрационе криве конструисане и концентрације читаване у Microsoft Excel софтверу. Резултат је изражен као µg одабраног једињења по 1 g сувог екстракта (µg једињења/g с.е.).

3.3.2. Одређивање укупног фенолног садржаја

За одређивање укупног фенолног садржаја у испитиваним екстрактима примењена је спектрофотометријска метода Singleton-а и сарадника прилагођена за микроплоче (123). Коришћен је *Folin-Ciocalteu* (FC) реагенс који се састоји из смеше фосфоволфрамове и фосфомолибденске киселине. Наведена метода подразумева оксидацију полифенолних једињења у присуству (FC) реагенса до феноксидних анјона, а редукцију реагенса до волфрам-оксида и молибден-оксида плаве боје. Интензитет плаве боје се детектује спектрофотометријски при апсорбацији $\lambda=760$ nm и директно је пропорционалан количини полифенола у испитиваним узорцима екстраката.



3.3.2.1 Реагенси

Реагенси који су коришћени за одређивање укупног фенолног садржаја у екстрактима ивањског цвећа су:

- FC реагенс (0,1 M)
- Раствор Na_2CO_3 (75 g/l)
- Основни раствор галне киселине 1 mg/ml који је даље разблаживан водом како би се добиле почетне концентрације у распону 80, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2,5, 1,25 и 0,625 $\mu\text{g/ml}$.
- Испитивани екстракти (250, 65 и 32,5 $\mu\text{g/ml}$).

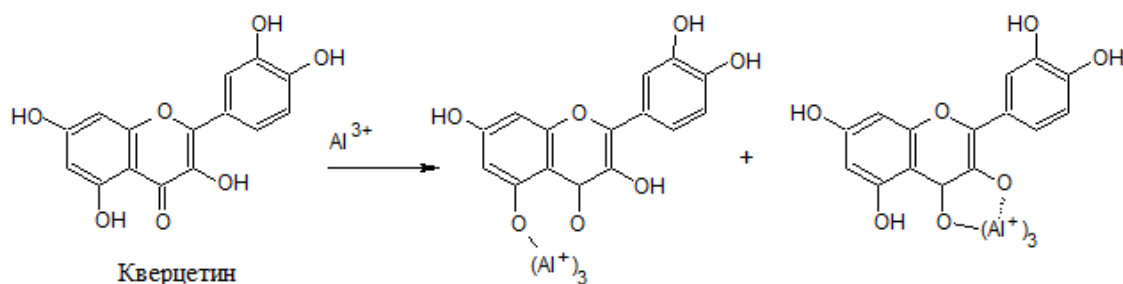
3.3.2.2. Поступак

Претходно споменути разблажени раствори галне киселине у распону концентрација 0,625 – 80 $\mu\text{g/ml}$ били су неопходни за конструисање калибрационе криве. Основни раствор екстракта је разблажен како би се добили раствори почетних концентрација од 250, 60 и 30 $\mu\text{g/ml}$. Реакциона смеша је обухватала: 30 μl екстракта који је помешан са 150 μL 0,1 M FC реагенса и 300 μL 120 μl 75 g/l Na_2CO_3 . Слепа проба је припремљена на исти начин осим што је уместо екстракта додат растварач (метанол/50% метанол/ dH_2O). Након 2 сата на собној температури апсорбанција раствора је очитана спектрофотометријски на таласној дужини 760 nm на *Multiskan Spectrum* читачу микроплоча (Thermo Scientific).

Садржај фенолних једињења израчунат је помоћу калибрационе криве стандардног раствора галне киселине (функције апсорбанције у зависности од концентрације). Резултат је приказан помоћу средње вредности три мерења и представља mg еквивалената галне киселине по g сувог екстракта) (123).

3.3.3. Одређивање укупног флавоноидног садржаја

Укупни флавоноидни садржај одређен је према претходно утврђеној методи *Chang*-а и сарадника, прилагођеној за микро плоче (124). Метода се заснива на особини флавоноида да са металима граде одговарајуће металне комплексе. У реакцији флавоноида са AlCl_3 , Al^{3+} се везује за укупне флавоноиде и настаје комплекс флавоноида са алумунијумом. Интензитет обојеног комплекса се одређује спектрофотометријски мерењем апсорбације на $\lambda=415 \text{ nm}$ и пропорционалан је садржају флавоноида у испитиваном узорку.



Слика 5. Реакција флавоноида са металом и настанак обојеног комплекса

3.3.3.1. Реагенси

Реагенси који су коришћени за одређивање укупног флавоноидног садржаја у екстрактима ивањског цвећа су:

- AlCl_3 (0,75 M)
- CH_3COONa (1 M)
- Основни раствор кверцетина 1 mg/ml који је даље разблаживан са 80% метанолом како би се добиле почетне концентрације кверцетина 84, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 и 0,625 $\mu\text{g/ml}$.
- Раствори испитиваних екстраката (1000, 250 и 625 $\mu\text{g/ml}$).

3.3.3.2. Поступак

Добијени распон концентрација кверцетина 0,625-84 $\mu\text{g/ml}$ био је неопходан за конструисање калибрационе криве. Раствори испитиваних екстраката били су у концентрацијама 1000, 250 и 625 $\mu\text{g/ml}$, а радне пробе у 3 понављања. Реакциона смеша је обухватала: 30 μl екстракта који је помешан са 90 μL метанола, 6 μl 0,75 М AlCl_3 , 6 μl 1 М CH_3COONa и 170 μl H_2O . Слепа проба је припремљена на исти начин осим што је уместо екстракта додат растварач (метанол/50% метанол/ dH_2O). Апсорбанција раствора је читавана спектрофотометријски на $\lambda=415$ nm на Multiskan Spectrum читачу микроплоча (Thermo Scientific) након 30 минута. Користећи калибрациону криву стандардног раствора кверцетина одређен је укупан садржај фенолних једињења. Резултат је приказан као средња вредност три мерења \pm стандардна девијација и представља mg еквивалената кверцетина по g сувог екстракта.

3.4. Испитивање способности неутрализације *DPPH* \cdot радикала екстраката

In vitro антиоксидациона активност одабраних екстраката ивањског цвећа процењена је помоћу методе за одређивање способности неутрализације *DPPH* \cdot (1,1-дифенил-2-пикрилхидразил) радикала. Коришћена је спектрофотометријска метода аутора Sánchez-Moreno и сарадника, прилагођена за микроплоче (125). Овај радикал се често примењује за одређивање способности једињења да „хватају“ слободне радикале (енгл. *free radical scavengers*), односно да донирају протон и електрон. Наиме тест се заснива на чињеници да када се фенолна једињења нађу у присуству стабилног азот-центрираног *DPPH* \cdot (љубичасти раствор) могу донирати водоник или електрон, при чему *DPPH* \cdot прелази у редуковани неутрални *DPPH*-H (жуте боје) (125, 126).

3.4.1. Реагенси

Реагенси који су коришћени за одређивање капацитета екстраката ивањског цвећа за неутралисање DPPH[•] :

- Основни раствор DPPH[•] реагенса: 3 mM (1,18 mg/ml) DPPH[•] у етанолу
- Радни раствор DPPH[•] реагенса: 67,2 μM (26,4 μg/mL) DPPH[•] у метанолу
- Екстракти:
 - Ацетонски и метанолни екстракти (250, 500, 1000, 2000, 4000, 8000 и 16000 μg/ml)
 - Водени екстракт (125, 250, 500, 1000, 2000 и 4000 μg/ml)
- Стандард бутиловани хидрокситолуен (ВНТ) (0,078 - 5 mg/mL)

3.4.2. Поступак

Серија раствора двоструктих разблажења припремљена је од екстракта почетних концентрација 300 mg/ml и 200 mg/ml и добијен је распон концентрација од 125–16000 μg/ml у зависности од типа екстракта. Радне пробе припремљене су у 3 понављања. Раствору узорка (10 μl екстракта/стандарда) је додато 100 μl 90 μmol/l DPPH[•] и 190 μl метанола. Као контрола уместо узорка коришћена је иста запремина растварача (метанол/50% метанол/dH₂O). Након 60 минута апсорбанција раствора је читавана спектрофотометријски на λ=515 nm на *Multiskan Spectrum* читачу микроплоча (Thermo Scientific) у тами на собној температури.

Неутрализација DPPH[•] радикала (енгл. RSC, *radical scavenging capacity*) екстраката (RSC_{DPPH[•]}) израчуната је на основу следеће једначине:

$$RSC_{DPPH^{\bullet}} (\%) = (1 - A/(A_{\text{кон}} - A_{\text{сп}})) \times 100\%$$

при чему је A_{кон} апсорбанција контроле, а A_{сп} апсорбанција слепе пробе.

Концентрација при којој је 50% радикала неутралисано назива се IC₅₀ вредност. Она се одређује на основу RSC_{DPPH[•]} вредности читавањем са графика који представља функцију RSC_{DPPH[•]} у % у зависности од концентрације, коришћењем софтвера за анализу података

Origine 8.0. Резултат се приказује као средња вредност три мерења IC₅₀ и изражава се у µg/ml.

3.5. Испитивање антимикробне активности екстраката

3.5.1. Лекови

Лекови који су коришћени као стандарди приликом одређивања антимикробне активности екстракта су антибиотик доксицилин (Галеника А.Д., Београд) и антиљивични лек флуконазол (Pfizer Inc., US).

3.5.2. Припрема екстраката и хранљиве подлоге

Испитивани екстракти су растворени у диметилсулфоксиду, а затим разблажени хранљивим течним медијумом у циљу добијања 10% раствора. Доксицилин је растворен је у Mueller-Hinton бујону, а флуконазол у Sabouraud dextrose бујону. Наведене хранљиве подлоге добијене су са Торлака, Београд.

Mueller-Hinton бујон представља стандардизовану подлогу прописану од стране Националног комитета за клиничке и лабораторијске стандарде Америке и користи се за испитивање антибактеријског деловања различитих агенаса. Састоји се из 2g месног екстракта, 17,5g казеин хидролизата и 1,5g скроба. Sabouraud dextrose бујон представља подлогу која се користи за узгој и одржавање гљивица (патогених и непатогених), нарочито оних које припадају групи дерматофита. Састоји се из 5g панкреатичне дигестије казеина, 5g пептичне дигестије животињског ткива, 40 g декстрозе и 15g агара.

3.5.3. Испитивани микроорганизми

Антимикробна активност екстраката била је тестирана на 20 микроорганизмама. Сви тестирани микроорганизми су представљени у табели 6. Клинички изолати патогених

бактерија су поклон Института за јавно здравље, Крагујевац, Србија. Остали микроорганизми биће обезбеђени из колекције Лабораторије за микробиологију, Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу.

Табела 6. Списак тестираних микроорганизама приликом одређивања антимикробне активности екстраката ивањског цвећа

| Бактерије | Гљиве |
|--|---------------------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | <i>Saccharomyces boulardii</i> |
| <i>Bacillus cereus</i> | <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Penicillium expansum</i> |
| <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 | <i>P. chrysogenum</i> |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | <i>P. italicum</i> |
| <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453 | <i>Trichoderma viridae</i> ATCC 13233 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | <i>Aspergillus flavus</i> ATCC 9170 |
| <i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 29544 | <i>A. fumigatus</i> ATCC 204305 |
| <i>Salmonella enteric</i> | <i>A. niger</i> ATCC 16404 |

3.5.4. Припрема суспензија

Колоније бактерија и гљива су узете са подлоге и суспендоване у 10 ml стерилног физиолошког раствора до настанка предвиђене густине суспензије која је одређена помоћу денситометра. Упоређивање густине је вршено са 0,5 McFarland стандардом, који је еквивалентан садржају бактеријске суспензије од око 10^8 CFU/mL, а суспензије квасца око 10^6 CFU/mL (CFU- Јединица за формирање колонија) (127). Суспензија спора гљива је припремљена пажљивим уклањањем спора из мицелија. Разблажење почетних суспензија вршено је коришћењем 0,85% стерилног физиолошког раствора у односу 1:100 за бактерије и кваснице и 1:1000 за филаментозне гљивице.

3.5.5. Поступак

За испитивање *in vitro* антимикуробне активности коришћена се микродилуциона метода уз помоћ ресазурина (128). Пластица за микротитар са 96 отвора напуњена је хранљивом подлогом (100 μ l), а 100 μ l сваког тестираног екстракта почетне концентрације 20 mg/mL додато је у први ред микротитарске плоче. Након тога се праве двострука разблажења тако да је распон концентрација екстракта од 10 mg/mL у првом реду до 0,078 mg/mL у последњем реду. Након тога се додаје 10 μ l суспензије бактерија, гљива и спора у одговарајуће отворе. Испитивана једињења су тестирана применом бактеријске концентрације од 5×10^5 CFU/ml и концентрације спора квасница и гљива од 5×10^3 CFU/ml. Након свега наведеног додат је ресазурин, супстанца плаво-љубичасте боје, која под утицајем оксидоредуктаза живих ћелија прелази у резорурфин који је розе флуоресцентне боје (129). Микротитарске плоче су инкубирани на 37 ° C око 24 часа за бактерије, на 28 ° C током 48 сати за квасце и 72 сата за споре гљива.

Антимикуробна активност се процењује на основу вредности минималне инхибиторне концентрације (МИК) и минималне микробицидне концентрације (ММК). МИК је дефинисана као најмања концентрација испитаног екстракта која неће довести до промене боје ресазурина од плаве до розе, док када је реч о филаментозним гљивама МИК представља најмању концентрацију екстракта која је спречила раст мицелије. МИК се одређује визуелно. Одређивање ММК спроводи се тако што се узорак (10 μ l) узме из отвора плоче у којој није дошло до раста бактерија и постави се на плочаста агар. Концентрација при којој се не детектује раст бактерија након предвиђеног периода инкубације означава се као ММК. Сваки тест је укључио контролу раста и контролу стерилности и изведен је у дупликату.

3.6. Испитивање антибиофилм активности екстраката

3.6.1. Припрема екстраката и хранљиве подлоге

Екстракти ивањског цвећа су растворени у DMSO, па онда разблажени Mueller-Hintonбујон-ом до настанка раствора концентрације од 10 %. Као стандард коришћен је доксициклин који је растворен у истој хранљивој подлози као и екстракти.

3.6.2. Испитивани микроорганизми

Антибиофилм активност екстраката ивањског цвећа тестирана је на 2 врсте бактерија: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Proteus mirabilis* ATCC 12453

3.6.3. Припрема суспензије

У циљу припремања суспензије бактерија колоније су узимане са подлоге и суспендоване у стерилном физиолошком раствору (5 ml). Густина суспензије је подешавана помоћу дензитометра (DEN-1, BioSan), на основу упоређивања са 1,0 McFarland стандардом.

3.6.4. Tissue culture plate (TCP) тест

TCP тест представља један од најчешће коришћених тестова за испитивање антибиофилм активности различитих агенаса и описали су га *Christensen* и сарадници (130). Сваки тест је подразумевао и контролу формирања биофилма. *O'Toole* и сарадници пружили су увид у процес настанка бактеријског биофилма (131). Прикључивање планктонских ћелија у подлоге за формирање сесилних ћелија представља почетни корак у настанку биофилма. Када се ћелије причврсте настављају да расту у заједници и као резултат награди се биофилм. Помоћу кристал виолет теста могуће је проценити везивање

ћелија, а тест се заснива на способности боје да продире у ћелијску мембрану везаних ћелија чиме се пружа слика о густини причвршћених ћелија. (132, 133). Антибиофилм активност изражава се као биофилм инхибиторна концентрација (БИК) односно најнижа концентрација екстракта која инхибира формирање биофилма (у процентима).

Плоче са 96 отвора су припремљене додавањем 100 μl хранљиве подлоге за бактерије (Mueller–Hinton) у сваки отвор. Из stock раствора испитиваних екстраката (концентрација 20 mg/mL) узето је 100 μL и додато у први ред плоче. Након тога вршено је серијско двоструко разблажење тестираних екстраката у сваком наредном реду, а добијени опсег концентрација раствора износио је од 10 до 0,78 mg/mL. Потом је 10 μL свеже суспензије бактерија, почетне концентрације 10^8 CFU/mL и разблажења у односу 1:100, пипетирано у сваки отвор. Инокулисане плоче су инкубиране на 37°C током 24 или 48 h, у зависности од тога да ли је реч о грам-негативним или грам-позитивним бактеријама. Додатних 24 часа плоче су инкубиране у циљу праћења утицаја екстракта на формирани биофилм.

Након инкубације садржај сваког отвора је пажљиво уклоњен, а отвори су испирани помоћу 200 μL раствора пуфера (0,15 M амонијум-сулфат, 0,1 M калијум-дихидрогенфосфат, 0,034 M натријум--дихидрогенцитрат и 0,001 M магнезијум-сулфат) да би се отклониле неадхериране бактерије. Додато је 100 μL метанола да би се фиксирао биофилм. Формирани биофилмови од везаних ћелија у отворима су обојени кристал виолетом (0,1% w/v) и инкубирани на собној температури током 20 минута. Вишак боје је уклоњен темељним испирањем са дејонизованом водом, а затим са 100 μL етанола. Оптичке густине обојених везаних ћелија бактерија су процењене помоћу микро ELISA читача плоча (RT-2100C, Rayto, Shenzhen, China) на таласној дужини од 630 nm. Само бујон или бујон са различитим концентрацијама тестираних екстраката служили су као контрола провере стерилности и неспецифичног везивања медијума. Тетрациклин је коришћен као позитивна контрола. Сви тестови су изведени у дуплику.

3.7. Испитивање антиинфламационе активности екстраката ивањског цвећа

3.7.1. Експерименталне животиње

У оквиру испитивања антиинфламациског деловања користиће се одрасли *Wistar albino* пацови мушког пола, старости 8 недеља, телесне масе 200-250g. Животиње ће бити чуване у строго контролисаним условима (температура $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, циклус светлост:тама 12:12 часова). Вода и храна су били доступни у довољној количини да би пацови могли да их узимају према потреби (*ad libitum*).

3.7.2. Индуција локалне инфламације и третман екстрактима

Испитивање антиедематозне активности спроведено је на моделу карагенином изазване инфламације шапе пацова. Карагенин је проинфламациона супстанца која примењена интраплантарно у шапу пацова изазива акутну инфламацију, која се карактерише брзом појавом еритема, едема и хипералгезије. Овај модел је високо репродуцибилан и често коришћен у научним истраживањима у циљу испитивања антиинфламационе активности различитих супстанци (134, 135).

Део истраживања који испитује антиинфламационе ефекте ивањског цвећа обухватио је 50 животиња подељених у две групе експерименталну и контролну. Свим пацовима изазвана је инфламација применом 1 ml 0,5% физиолошког раствора карагенина интраплантарно у задњу леву шапу пацова.

Експериментална група (садржи три подгрупе у зависности од дозе екстракта, 10 животиња по подгрупи):

- 1) Животиње се третирају акутном интраперитонеалном (i.p.) инјекцијом екстраката у дози од 50mg/kg, 60 минута пре изазивања инфламације.
- 2) Животиње се третирају акутном i.p. инјекцијом екстраката у дози од 100mg/kg, 60 минута пре изазивања инфламације.

- 3) Животиње се третирају акутном i.p. инјекцијом екстраката у дози од 200mg/kg, 60 минута пре изазивања инфламације.

Контролна група (садржи две подгрупе, 10 животиња по групи):

- 1) Животиње се третирају акутном i.p. инјекцијом у индометацина суспендованог у физиолошком раствору у дози од 8mg/kg, 60 минута пре изазивања инфламације.
- 2) Животиње се третирају i.p. инјекцијом физиолошког раствора, 60 минута пре изазивања инфламације.

3.7.3. Одређивање антиинфламационе активности екстраката

У циљу квантификације антиинфламацијског ефекта примењених екстраката мерена је дебљина ткива леве шапице сваког пацова у следећим тренуцима: непосредно пре изазивања инфламације и 1,2,3,4 часа након инфламације. Дебљина ткива се мери на средини шапице пацова коришћењем дигиталног калипера. Процент инхибиције едема шапице рачуна се према формули:

$$\% \text{ инхибиције} = 100 \times [1 - (Y_t / Y_c)]$$

Где је Y_t = просечно повећање дебљине шапе у третираној групи пацова између два тренутка мерења, а Y_c = просечно повећање дебљине шапе у третираној групи пацова између два тренутка мерења.

3.8. Испитивање кардиопротективних ефеката екстраката ивањског цвећа

3.8.1. Експерименталне животиње

У оквиру испитивања ефеката екстраката ивањског цвећа на исхемијско-реперфузионо оштећење срца користили су се здрави и спонтано-хипертензивни пацови мушког пола, старости 8 недеља, телесне масе 200-250g. Овај део истраживања обухватио

је 80 животиња (по 10 у свакој групи) које су биле подељене у две групе, експерименталну и контролну.

Експериментална група је на основу присуства или одсуства спонтано развијене хипертензије и примењене дозе екстракта била подељена у 6 подгрупа (10 по свакој подгрупи):

- 1) **500 GVE**- нормотензивне животиње које су третиране екстрактом ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg *per os* у трајању од 4 недеље.
- 2) **250 GVE**- нормотензивне животиње које су третиране екстрактом ивањског цвећа у дози од 250 mg/kg *per os* у трајању од 4 недеље.
- 3) **125 GVE**- нормотензивне животиње које су третиране екстрактом ивањског цвећа у дози од 125 mg/kg *per os* у трајању од 4 недеље.
- 4) **SHR + 500 GVE** спонтано-хипертензивне животиње које су третиране екстрактом ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg *per os* у трајању од 4 недеље.
- 5) **SHR + 250 GVE** спонтано-хипертензивне животиње које су третиране екстрактом ивањског цвећа у дози од 250 mg/kg *per os* у трајању од 4 недеље.
- 6) **SHR + 125 GVE** спонтано-хипертензивне животиње које су третиране екстрактом ивањског цвећа у дози од 125 mg/kg *per os* у трајању од 4 недеље.

Контролна група је била подељена у 2 подгрупе:

- 1) **CTRL**- здрави *Wistar albino* пацови који нису конзумирали екстракте ивањског цвећа током периода од 4 недеље, већ су користили стандардну храну и воду за пиће.
- 2) **SHR**-спонтано-хипертензивни *Wistar kyoto* пацови који нису конзумирали екстракте ивањског цвећа током периода од 4 недеље, већ су користили стандардну храну и воду за пиће.

Како би се обезбедила прецизна количина лека за сваку животињу, пацови су чувани у одвојеним кавезима (једна животиња по кавезу). Будући да пацови пију у просеку 50 ml воде, у тој запремини је растворена појединачна доза екстракта прилагођена телесној маси пацова. Иста процедура је понављана сваког дана експерименталног протокола током 28 дана. Након конзумације екстраката у периоду од 4 недеље, све животиње су

жртвоване, након чега се други део истраживања обавио на *ex vivo* моделу изолованог срца пацова.

3.8.2. Испитивање *ex vivo* функције срца

Испитивање *ex vivo* функције срца обављено је помоћу модела ретроградне перфузије изолованог срца по *Langendorff*-у (*Langendorff apparatus, Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary*).

3.8.2.1. Модел изоловане ретроградне перфузије по *Langendorff*-у

Модел изоловане ретроградне перфузије по *Langendorff*-у сматра се погодним за је проучавање функције срца и коронарне циркулације изолованог срца сисара (пас, заморчић, пацов, зец, мачка). Постоје две технике рада на *Langendorff* апарату од којих се једна базира на перфузији срца при константном протоку, док се друга односи на перфузију срца при константном притиску кроз коронарно васкуларно корито. У овом истраживању применили смо методу перфузије срца при константном коронарном перфузионом притиску од 70 cmH₂O.

Апарат се састоји из две вертикалне стаклене цеви (мања се налази у већој) између којих протиче вода загрејана до физиолошке температуре од 37 °C. Подешавање температуре омогућено је захваљујући воденом купатилу које омогућава на тај начин и загревање читавог система. *Krebs-Henseleit*-ов раствор је раствор који протиче кроз апарат и исхрањује срце. По хемијском саставу садржи све компоненте сличне екстрацелуларној течности и помоћу негативног притиска убацује се у цев мањег калибра. Цев мањег калибра се завршава канилом на коју се поставља изоловано срце пацова. Резервоар који садржи *Krebs-Henseleit*-ов раствор је повезан са цеви мањег калибра и боцом са смешом гасова O₂ : CO₂ у односу 95% : 5%. Улога боце са смешом гасова је да омогући постизање физиолошког парцијалног притиска O₂ и CO₂ који је присутан у артеријској крви као и да допрема раствор до унутрашње цеви система помоћу негативног притиска који настаје у резервоару. Изоловано срце се помоћу асцедентне аорте прикачи за канилу која се налази на завршном делу цеви мањег калибра и омогућава се несметан проток *Krebs-Henseleit*

раствора кроз срце. Сензор односно трансдјусер има улогу континуираног праћења срчане функције и физички је повезан са лучно савијеном, танком металном цеви на чијем се крају налази балон испуњен дестилованом водом. Прокидањем митралне валвуле између леве преткоморе и леве коморе уводи се балон сензора у леву комору. Рачунар са одговарајућим софтвером (*Spel Advanced HaemoSys v3.24*) добија информације о раду срца помоћу сензора и преводи их у излазне податке помоћу математичких формула. На тај начин читавањем вредности са рачунара омогућено је континуирано праћење кардиодинамских параметра рада срца и регистравање следећих параметара рада леве коморе:

- $dp/dt \max$ – максимална стопа промене притиска у левој комори која се изражава у mmHg/s;
- $dp/dt \min$ – минимална стопа промене притиска у левој комори која се изражава у mmHg/s;
- SLVP – систолни притисак у левој комори који се изражава у mmHg;
- DLVP – дијастолни притисак у левој комори који се изражава у mmHg;
- HR – фреквенца рада срца која се изражава као број откуцаја по минути (енгл. *beats per minute*, bpm).

Коронарни проток (CF) је мерен флоуметријски (flowmetrically) и изражава се у ml коронарног венског ефлуента у минути. Будући да је лева комора морфолошки и функционално доминантија, праћење њене функције може осликати рад срца у целости.

3.8.2.2. *Krebs-Hensenleit* раствор за перфундовање срца

Krebs-Hensenleit-ов перфузиони раствор доводи хранљиве материје до срца и омогућава његову исхрану и несметан рад на апарату. Компоненте које улазе у његов састав су: натријум хлорид (NaCl – 118 mmol/L), калијум хлорид (KCl – 4,7 mmol/L), магнезијум сулфата ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,66 mmol/L), калијум дихидроген фосфат ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 1,18 mmol/L), натријум бикарбонат (NaHCO_3 – 24,88 mmol/L), глюкоза ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \times \text{H}_2\text{O}$ – 5,5 mmol/L) и калцијум хлорид (CaCl_2 – 2,52 mmol/L). рН вредност раствора износи 7,4.

3.8.2.3. Изоловање и припрема срца

Након краткотрајне наркозе интраперитонеалном применом комбинације кетамина и ксилазина сви пацови се жртвују цервикалном дислокацијом (*Schedule 1 of the Animals/Scientific Procedures, Act 1986, UK*). Отвара се абдомен, лучно сече дијафрагма, након тога се врши отварање грудног коша лучно, дуж мамиларне линије, да би се у крајњем пресецањем перикарда изоловало срце. Током процеса изолације срце се прелива хладним физиолошким раствором температуре од (+4°C) како би се у трајању манипулације одржао његов рад у оквирима хомеостазе. По уклањању из организма одмах се ставља у ледени физиолошки раствор како би се импровизовала тзв. „физиолошка клешта“ која метаболичке процесе у срцу своде на минимум. Тупом препарацијом срца се уклањају непотребни делови и издваја асцендентна аорта која ће се причврстити за канилу. У делу аурикуле приступа се левој преткомори, пинцетом се прокидају митрални залисци и омогућава улазак сензора.

3.8.3. Експериментални протокол

Након постављања срца на апарат чека се успостављање стабилног рада које се верификује непромењеним вредностима коронарног протока и параметара функције срца након неколико узастопних мерења. Након стабилизације срца су подвргнута глобалној исхемији у трајању од 20 мин затварањем протока кроз срце, након чега је успостављена реперфузија (поновно успостављање протока) у трајању од 30 минута. Коронарни венски ефлуент прикупљан је у следећим тачкама експеримента: у тачки стабилизације (С), у првој тачки реперфузије након двадесетоминутне исхемије (Р1), као и на сваких 5 минута током периода реперфузије (Р2-Р7). У наведеним интервалима софтверски су бележени и сви претходно наведени кардиодинамски параметри.

3.9. Испитивање ефеката ивањског цвећа на системски и срчани редокс статус

Током жртвовања животиња узорци крви за биохемијске анализе су сакупљени из југуларне вене у циљу испитивања ефеката ивањског цвећа на системски редокс статус. Након центрифугирања крви издвојени су плазма и лизат еритроцита. У узорцима плазме одређивани су прооксиданси као што су: индекс липидне пероксидације - мерен као TBARS, азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-), супероксид анјон радикал (O_2^-) и водоник пероксид (H_2O_2). Следећи параметри антиоксидационе заштите су одређивани из узорака еритроцита: активност супероксиддизмутазе (SOD) и каталазе (CAT), као и ниво редукованог глутатиона (GSH). Како би се испитали ефекти екстракта ивањског цвећа на срчану продукцију прооксиданаса у узорцима коронарног венског ефлуента одређивани су нивои: TBARS, NO_2^- , O_2^- и H_2O_2 . Све биохемијске анализе одрађене су спектрофотометријски (Specord S-600 Analytik Jena, Велика Британија).

3.9.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (мерен као TBARS)

Индекс липидне пероксидације одређиван је индиректно мерењем продукта реакције липидне пероксидације са тиобарбитурном киселином, односно нивоа TBARS (енгл. *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*). Спектрофотометријска метода се базира на одређивању нивоа липидних пероксида на основу реакције малонилдиалдехида (MDA) са тиобарбитурном киселином (ТВА) (136).

3.9.1.1. Реагенси

Реагенси који су коришћени за одређивање нивоа TBARS су: 2-тиобарбитурна киселина (ТВА), 28% трихлорсирћетне киселине (ТСА) и натријум хидроксид (NaOH).

3.9.1.2. Поступак

У епрувету је стављено 800 μl узорка односно коронарног венског ефлуента и 200 μl 1% ТВА у 0,05 М натријум хидроксиду. Узорци су инкубирани у воденом купатилу у трајању од 15 минута, при температури од 100°C, након чега су 15 минута инкубирани на собној температури пре одређивања апсорбанције. Апсорбанција је мерена спектрофотометријски на $\lambda=530\text{nm}$. *Krebs-Hensenleit* раствор је коришћен као слепа проба, у количини еквивалентној запремини коронарног венског ефлуента.

Протокол за одређивање нивоа TBARS у плазми се незнатно разликује. Наиме помеша се 400 μl 28% ТСА и 800 μl плазме и остави 15 минута на леду. Након тога следи процес центрифугирања у трајању од 15 мин при 6000 rpm. У 800 μl супернатанта додаје се 200 μl 1% ТВА, а потом се добијени узорци инкубирају у воденом купатилу 15 минута на 100°C. Наставак протокола је исти као и за коронарни венски ефлуент. Дестилована вода је коришћен као слепа проба, у количини еквивалентној запремини плазме.

Концентрација ослобођених TBARS израчуната је на основу следеће једначине:

$$\text{nmol TBARS/ml ефлуента или плазме} = \Delta A (A_y - A_{\text{сп}}) / 1.56 \times 1.25$$

при чему је A_y апсорбанца узорка, док је $A_{\text{сп}}$ апсорбанца слепе пробе, док су 1,56 и 1,25 корекциони фактор за овај есеј.

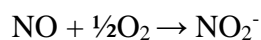
Количина ослобођених TBARS по граму срчаног ткива израчуната је на следећи начин:

$$\text{nmol TBARS/минути/g wt} = \Delta A / 1.56 \times 1.25 \times CF / m_{\text{срца}}$$

Ниво TBARS се изражава у μM , за разлику од осталих мерених про-оксиданаса чија је концентрација изражавана у nM јер је количина TBARS за један ранг величина већа од свих осталих параметара.

3.9.2. Одређивање нитрита (NO_2^-)

Мерење нивоа ослобођених нитрита у коронарном венском ефлуенту представља погодну методу за индиректну процену функционалности ендотелног L-аргинин:NO система у коронарној циркулацији. Азот моноксид (NO) у реакцији са молекуларним кисеоником доводи до настанка нитрита (NO_2^-) на следећи начин:



Како у овој реакцији настаје еквимоларна количина нитрита, сматра се да је ниво нитрита у коронарном венском ефлуенту заправо ниво ослобођеног азот монооксида. Метода се заснива на коришћењу *Griess*-ов реагенса који у присуству нитрита доводи до настанка диазо-комплекса љубичасте боје (137).

3.9.2.1. Реагенси

Реагенси који су коришћени за одређивање нивоа NO_2^- су: сулфанилна киселина (4-амино бензенсулфонска киселина), N-(1-нафтил)-етилендиамин дихидрохидрат (NEDA), амонијум хлорид (NH_4Cl), боракс ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$), 85% орто-фосфорна киселина (H_3PO_4), $\rho=1,685 \text{ gcm}^{-3}$; натријум нитрит (NaNO_2).

3.9.2.2. Поступак

Griess-ов реагенс се припрема *ex tempore* тако што се помешају једнаке запремине (v/v) 1 % сулфанилне киселине растворене у 5 % орто-фосфорној киселини и 0,1 % воденог раствора N-(1-нафтил)-етилендиамин дихидрохлорида (NEDA).

У епрувет (12 x 100) се пипетира 1 ml коронарног венског ефлуента, 250 μl свеже направљеног *Griess*-ов реагенса и 125 μl амонијачног пуфера (pH=9.0). Амонијачни пуфер садржи амонијум хлорид (NH_4Cl) и натријум тетраборат ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) и има улогу у стабилизацији диазо-комплекса. *Krebs-Hensenleitov* раствор користи се као слепа проба.

Концентрација ослобођених нитрита одређује се на основу калибрационе криве. Конструисање калибрационе криве врши се на основу екстинкција узорака који у себи

садрже познату концентрацију нитрита, након реакције са *Griess*-овим реагенсом у присуству пуфера. Добија се пипетирањем 3, 6, 12 и 24 μl воденог раствора 1 mM NaNO_2 у 1 ml Krebs-Hensenleitov-ог раствора чиме се добија концентрација нитрита од 2.18, 4.37, 8.73 и 17.34 $\text{nmol NO}_2^-/\text{ml}$. Након 5-10 минута долази до стабилизације боје на собној температури и приступа се одређивању концентрације ослобођених нитрита спектрофотометријски на таласној дужини од $\lambda=550\text{ nm}$. Концентрација, а затим количина ослобођених нитрита добијана је на основу:

Одређивања стандардног фактора (F), који се добијао из следеће једначине:

$$\frac{\text{Екстинкција стандарда-екстинкција слепе пробе}}{\text{Концентрација NaNO}_2 \text{ у стандарду}}$$

за сваки појединачни стандард (F1-F4), а затим добијањем њихове аритметичке средине.

Дељењем разлике екстинкција узорка и слепе пробе са стандардом F:

$$\text{nmol NO}_2/\text{ml ефлуента} = \Delta E (E_u - E_{sp})/F.$$

Након тога, количина ослобођених нитрита по граму срчаног ткива се одређивала на следећи начин:

$$\text{nmol NO}_2/\text{минут/g wt} = \Delta E/F \times CF \text{ (коронарни проток)}/m_{\text{срца}}$$

3.9.3. Одређивање супероксид анјон радикала (O_2^-)

Одређивање количине супероксид анјон радикала (O_2^-) у коронарном венском ефлуенту и плазми заснива се на реакцији O_2^- са нитро тетразолијум плавим (енгл. *Nitro Blue Tetrazolium*, NBT) при чему настаје нитроформазан плави (138). Мерење се спроводи на таласној дужини $\lambda_{\text{max}}=550\text{ nm}$.

3.9.3.1. Реагенси

Реагенси који су коришћени за одређивање нивоа O_2^- су: TRIS (Трис (хидроксиметил) аминотетан, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$), 37% хлороводонична киселина (HCl), $\rho=1,19$

gcm⁻³, Na₂EDTA, Нитро-тетразолијум плаво хлорид (NBT, C₄₀H₃₀ClN₁₀O₆), Желатин (C₁₅H₁₁N₂ NaO₂).

3.9.3.2. Поступак

У епрувете (12x100) се пипетира 50 μ l узорка и 950 μ l есејне смеше. Есејна смеша (“*assay mixture*”) представља смешу 50 mM TRIS-HCl пуфера (pH=8,6), 0,1 mM EDTA, 0,1 mg/ml желатина и 0,1 mM NBT. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћен је *Krebs-Hensenleitov* раствор. На почетку реакције измери се екстинкција смеше и то се означава као екстинкција E₁. Затим се на сваких 60 секунди врши мешање пластичним штапићем и нотира екстинкција након мешања и тај поступак се понавља до достизања приближно исте вредности две узастопне екстинкције. Последња екстинкција се означава као E₂. Исти поступак се спроводи и за слепу пробу.

Концентрација ослобођеног O₂⁻ добијена је на основу следећих једначина

$$\Delta E_u = E_{2u} - E_{1u} \text{ (за узорак)}$$

$$\Delta E_{sp} = E_{2sp} - E_{1sp} \text{ (за слепу пробу)}$$

$$\Delta E = \Delta E_u - \Delta E_{sp}$$

$$\text{nmol O}_2^-/\text{ml ефлуента} = \Delta E / 0.015 \times 1 / 0.05$$

Након тога, количина ослобођеног O₂⁻ по граму срчаног ткива се одређивала према следећој једначини:

$$\text{nmol O}_2^-/\text{минут/g} = \Delta E / 0.015 \times 1 / 0.05 \times CF / m_{\text{срца}}$$

3.9.4. Одређивање водоник пероксида (H₂O₂)

Одређивање H₂O₂ заснива се на оксидацији фенол црвеног помоћу водоник пероксид реакције која је катализована ензимом пероксидазом из коњске ротквице (енгл. *HorserradishPerOxidase* - HRPO). Ова реакција доводи до формирања једињења чији је максимум апсорпције $\lambda_{\text{max}}=610\text{nm}$ (139). Линеарна зависност апсорбанце 610nm од концентрациј H₂O₂ је постојана за 1-60 μ M опсег концентрација (1-60 nmol/ml). Овом

методом могуће је одредити настанак и ослобађање H_2O_2 у току временског интервала од 5-60 минута.

3.9.4.1. Реагенси

Реагенси који су коришћени за одређивање нивоа H_2O_2 су: калијум хидрогенфосфат дихидрат ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), калијум дихидрогенфосфат дихидрат ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), натријум хлорид (NaCl), водоник пероксид (H_2O_2), D(+)-глукоза монохидрат (декстроза), фенол црвено (енгл. *phenol red*, $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_5\text{S}$), пероксидаза из коњске ротквице (енгл. *peroxidase from horse radish*, HRPO EC 1.11.1.7).

3.9.4.2. Поступак

У епрувете (12x100) се пипетира 200 μl коронарног венског ефлуента и 800 μl свеже направљеног раствора фенол црвеног (енгл. *Phenol Red Solution-PRS*). PRS настаје мешањем 140 mM NaCl , 10 mM калијум фосфатног пуфера ($\text{pH} = 7$), 5,5 mM D(+)-глукозе и 0,28 mM фенол црвеног. Након тога се у узорке дода 10 μl (1:20) HRPO који је припремљен *ex tempore*. Узорци се остављају на собној температури 10 минута, након чега се помоћу 1 M NaOH подеси $\text{pH} \approx 12$. Као слепа проба се користи *Krebs-Hensenleitov* раствор уместо коронарног венског ефлуента.

Концентрација ослобођеног H_2O_2 у коронарном венском ефлуенту израчунава се на основу стандардне криве, одређиване за сваки есеј. За конструкцију стандардне криве, користи се стандардни (Stock) раствор H_2O_2 , уз претходну проверу концентрације (A_{230} за 10 mM H_2O_2 износи 0,810). У 3 епрувете се пипетира: 5, 10 и 20 μl 1 mM раствора H_2O_2 (уместо коронарног венског ефлуента), 200 μl дестиловане, 800 μl раствора фенол црвеног и 10 μl (1:20) HRPO. Након инкубације у трајању од 10 минута на собној температури, подешава се pH вредност око 12 помоћу 10 μl 1 M NaOH . Финална концентрација H_2O_2 у 3 узорака стандарда износила је: 2,75; 5,49; и 10,99 nmol/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{ml}$. Мерење апсорбанце (A) спровођене су спектрофотометријски на таласној дужини максималне апсорпције $\lambda_{\text{max}} = 610\text{nm}$, у стакленим киветама запремине 1 ml. Од добијених апсорбанци одузимана је

вредност апсорбанце слепе пробе (B), чиме се добија коначна апсорбанца (ΔA). Концентрација, а затим и количина ослобођеног H_2O_2 у коронарном венском ефлуенту израчунавана је на основу:

1) Фактора апсорбанце (F) по једном nmol-у водоник пероксида:

$$F = \Delta A / \text{nmol } H_2O_2 / \text{cuv}$$

2) на основу апсорбанце узорка на $\lambda_{\max} = 610 \text{ nm}$ (A_u) и њеног упоређивања са слепом пробом (A_{sp}) израчунава се финална апсорбанца (ΔA) ($A = A_u - A_{sp}$). Помоћу овако добивене апсорбанце, фактора F и количине коронарног венског ефлуента употребљеног опотребљеног у есеју (200 ml) израчунавана је концентрација и количина H_2O_2 у коронарном венском ефлуенту по формули:

$$\text{nmol } H_2O_2 / \text{ml ефлуента} = \Delta A / F$$

3) количина ослобођеног H_2O_2 по граму срчаног ткива се одређивала на следећи начин:

$$\text{nmol } H_2O_2 / \text{ml /минут/g wt} = \Delta A / F \times CF / m_{\text{срца}}$$

3.9.5. Одређивање каталазе (CAT)

Активност каталазе у сонификату одређује се применом методе по *Beutler*-у (140). Метода се састоји у спектрофотометријском праћењу брзине разградње водоник-пероксида у присуству каталазе на таласној дужини од 230 nm при којој H_2O_2 апсорбује светлост. Прецизна концентрација водоник-пероксида се одређује у односу на апсорпцију разблаженог раствора пуфера (1:10). Као нула, читава се апсорпција раствора састављеног од 0,9 ml разблаженог пуфера и 0,1 ml разблаженог 30% раствора H_2O_2 (1:100). Концентрација водоник пероксида израчунава се на основу екстинкционог коефицијента, који је за H_2O_2 на 230 nm, 0,071, по формули:

$$C = \Delta A / 0,071$$

Након тога, добијена концентрација се разблажује до 10 mM.

3.9.5.1. Поступак

У кварцну кивету у којој се налази 50 μl пуфера додаје се између 5 и 50 μl узорка (зависно од активности каталазе). Додатком 1 ml 10 mM раствора водоник-пероксида иницира се реакција разградње водоник-пероксида под утицајем каталазе. Пад апсорбанције прати се на таласној дужини 230 nm у току 3 минута. Активност се изражава у јед/mg протеина, а јединица је дефинисана као количина редукованог H_2O_2 , изражена у μM у минути. Израчунавање се врши према следећој једначини:

$$\Delta A * R / 0,071 * Low * V$$

при чему је ΔA – промена апсорбанце у минути; R – разблажење; V – запремина узорка (ml); Low – количина протеина (mg/ml сонификата).

3.9.6. Одређивање супероксид дисмутазае (SOD)

Одређивање активности SOD спроводи се помоћу епинефринске методе која се заснива на праћењу смањења брзине аутооксидације у алкалној средини, која зависи од O_2^- (141). SOD уклања O_2^- и на тај начин спречава аутооксидацију епинефрина. Брзина аутооксидације се детектује спектрофотометријски на апсорбанци од 480 nm. Контролу представља брзина аутооксидације епинефрина у одсуству SOD, док брзина аутооксидације епинефрина у присуству SOD представља део референтних вредности.

3.9.6.2. Поступак

У епрувету се дода 100 μl лизата и 1 ml карбонатног пуфера чиме се започиње процес. Након тога се додаје 100 μl епинефрина. Мерење се врши спектрофотометријски на таласној дужини од 470 nm.

Активност SOD се изражава у јединицама њене активности по граму Hb (unit/gHb) (142). Израчунавање се врши према наведеној реакцији:

$$\text{SOD} - 1 = 2(\Delta K - \Delta A) * R / V * \text{Hb} * \Delta K$$

ΔK је промена апсорпције контролне реакције у минути; ΔA је промена апсорпције реакције са узорком у минути; V је запремина узорка која се сипа у реакциону смешу (ml); Hb количина хемоглобина (g/100ml лизата); R је разблажење.

3.9.7. Одређивање редукованог глутатиона (GSH)

Ниво GSH у еритроцитима се одређује спектрофотометријски по методи *Beutler*-а која се заснива на оксидацији глутатиона GSH помоћу 5,5–дитио-бис-6,2-нитробензоеве киселином (DTNB) (143).

3.9.7.1. Поступак

GSH се екстрахује тако што се у 0,1 ml 0,1% EDTA дода 0,4 ml узорка и 0,75 ml раствора за преципитацију. Овај раствор се прави према тако што се помеша 1,67 g метафосфорне киселине, 0,2 g EDTA, 30 g NaCl, а потом допуни до 100 ml дестилованом водом. После мешања на *Vortex* мешалици наведена смеша се екстрахује 15 минута на леду и центрифугира 10 минута на 4000 rpm. У епрувете (12 x 100) се пипетира 300 μ l узорка, 750 μ l Na_2HPO_4 и 100 μ l DTNB (1 mg DTNB/ml 1% натријум цитрата). Као слепа проба се користи дестилована вода. Мерење нивоа GSH се одвија спектрофотометријски у кварцним киветама запремине 1 ml.

Концентрација, а затим и количина редукованог глутатиона у еритроцитима одређује се на основу стандардне криве за сваки есеј. За конструкцију стандардне криве користи се стандардни *Stock*-раствор редукованог глутатиона концентрације 1,5 mmol/l тако што се у 4 епрувете пипетира 10, 20, 30 и 40 μ l 1 mM раствора GSH, 300 μ l хладног перфузионог *Krebs-Hensenleit*-овог раствора. На овај начин се одређује концентрација нитрита у узорцима стандарда (nmol/GSH/ml). Мерење апсорбанце (A) врши се на таласној дужини максималне апсорпције од 420 nm. Од добијених апсорбанци одузима се вредност апсорбанце слепе пробе (B), чиме се добија коначна апсорбанца (ΔA).

Помоћу овако добијене апсорбанце, стандардног фактора (F), и количине венског ефлуента употребљеног у есеју израчунава се концентрација глутатиона у венском ефлуенту према следећој формули:

$$\text{nmol GSH / ml еритроцита} = \Delta A / F$$

3.10. Хистопатолошка анализа срца пацова

У моменту жртвовања изоловани су бубрег и јетра сваке животиње, док су срца узета по завршетку протокола И-Р на *Langendorff*-овом апарату. Наведени органи су фиксирани у 10% раствору формалдехида на собној температури. Запремина раствора коришћеног за фиксацију била је 10 пута већа у односу на запремину органа. Након тога су органи укалупљени у парафинске блокове и исечени на резове дебљине 5 μm помоћу микротоме. Пресеци су нанешени на предметна стакла, а затим бојени хематоксилином и еозином (H&E).

3.10.1. Поступак

Парафински исечци су претходно загрејани у термостату на +56 °C у трајању од 45 минута. Затим су депарафинисани у ксилолу и испирани у опадајућим концентрацијама етил алкохола у циљу дехидратације ткива на следећи начин: два пута по 5 минута у апсолутном алкохолу, 5 минута у 96% алкохолу, 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 70% алкохолу и на крају 5 минута у дестилованој води. Препарати су бојени *Mayer*-овим хематоксилином (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) 10 минута, а потом су испирани дестилованом водом, а након тога текућом водом у трајању од 5 минута. Препарати су затим бојени алкохолним еозином (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) 2 минута. Након бојења ткиво је дехидратисано и просветљено у ксилолу. У циљу дехидратације коришћене су растуће концентрације алкохола и то: 5 минута у 70% алкохолу, затим 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 96% алкохолу и на крају два пута по 5 минута у апсолутном алкохолу. Након бојења и поступка дехидратације, добијени препарати су просветљени потапањем током једног минута у мешавини ксилола и апсолутног алкохола

у односу 1:1, а потом два пута по 1 минут само у ксилолу. Ткивни исечци су прекривени канада балзамом (*Canada balsam, Centrohem*, Србија) и покровним стаклима. Након сушења у трајању од 24 сата препарати су анализирани под светлосним микроскопом (*Olympus, Japan*). Резултати хистопатолошке анализе, односно Н&Е бојења ћелија, приказани су сликама (144).

3.11. Снага студије и величина узорка

Прорачун укупног узорка је заснован на резултатима претходно публикованих студија (145). За прорачун је коришћен *t*-тест за везани узорак, двоструко, уз претпоставку алфа грешке од 0,05 и снаге студије 0,8 (бета грешка 0,2) и уз коришћење одговарајућег рачунарског програма (146).

Узимајући у обзир резултате ових студија, укупан број експерименталних животиња је прорачунат на 104 (по 8 у свакој групи). Имајући у виду могућност искључења неких експерименталних животиња из завршне анализе, укупни студијски узорак је утврђен на најмање 130 експерименталних животиња.

3.12. Статистичка обрада података

За статистичку обраду података коришћен је статистички пакет *IMB SPSS 20.0 for Windows*. За испитивање нормалности расподеле користили су се тестови *Kolmogorov Smirnov* и *Shapiro Wilk* и хистограм и *normal QQ plot*. За тестирање разлика између параметара, у зависности од њихове природе, користили су се Студентов *t*-тест, *Mann-Whitney* тест, Фишеров тест апсолутне вероватноће, једнофакторска или двофакторска анализа варијансе. Ако се утврди да постоји статистички значајна разлика између група користио се *Bonferroni* тест како би се утврдило између којих група се појавила статистички значајна разлика. Вредности су приказане као средња вредност (\bar{X}) \pm стандардна девијација (*SD*), при чему се за статистичка значајност подразумева да је $p < 0,05$. За креирање графикона и табела коришћен је *Microsoft Excel*.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Утицај растварача различите поларности на принос екстраката ивањског цвећа

Приликом екстракције надземног дела ивањског цвећа коришћени су вода, метанол и ацетон као растварачи. У зависности од поларности коришћених растварача садржај сувог екстракта у испитиваним узорцима налазио се у опсегу од 8,9 до 12,3 (Табела 7).

Табела 7. Приноси екстракције ивањског цвећа употребом растварача различите поларности

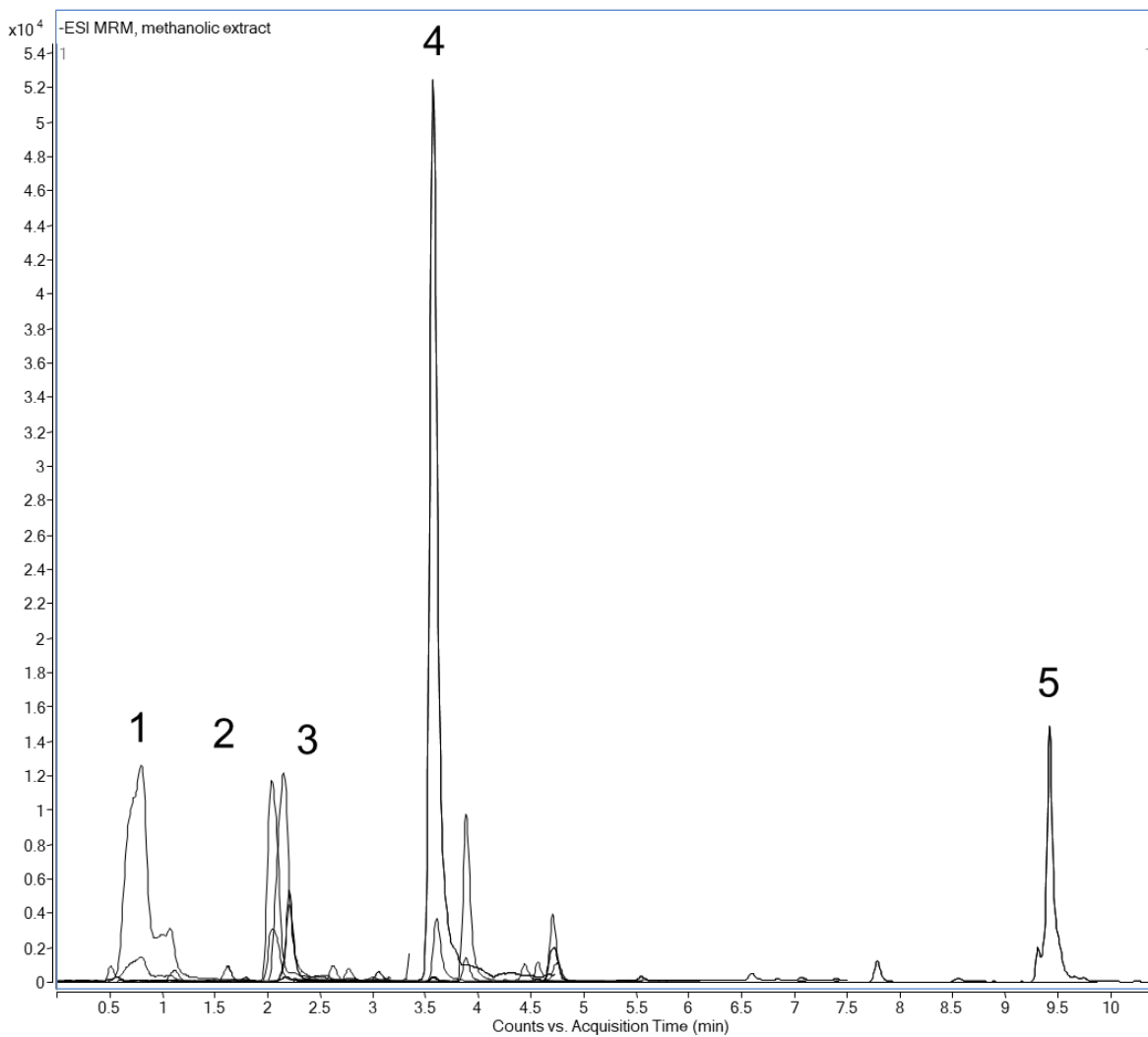
| <i>Растварач</i> | <i>Принос екстракта (g/100g дроге) %</i> |
|------------------|--|
| Вода | 10,2 |
| Метанол | 12,3 |
| Ацетон | 8,9 |

4.2. Хемијска карактеризација екстраката ивањског цвећа

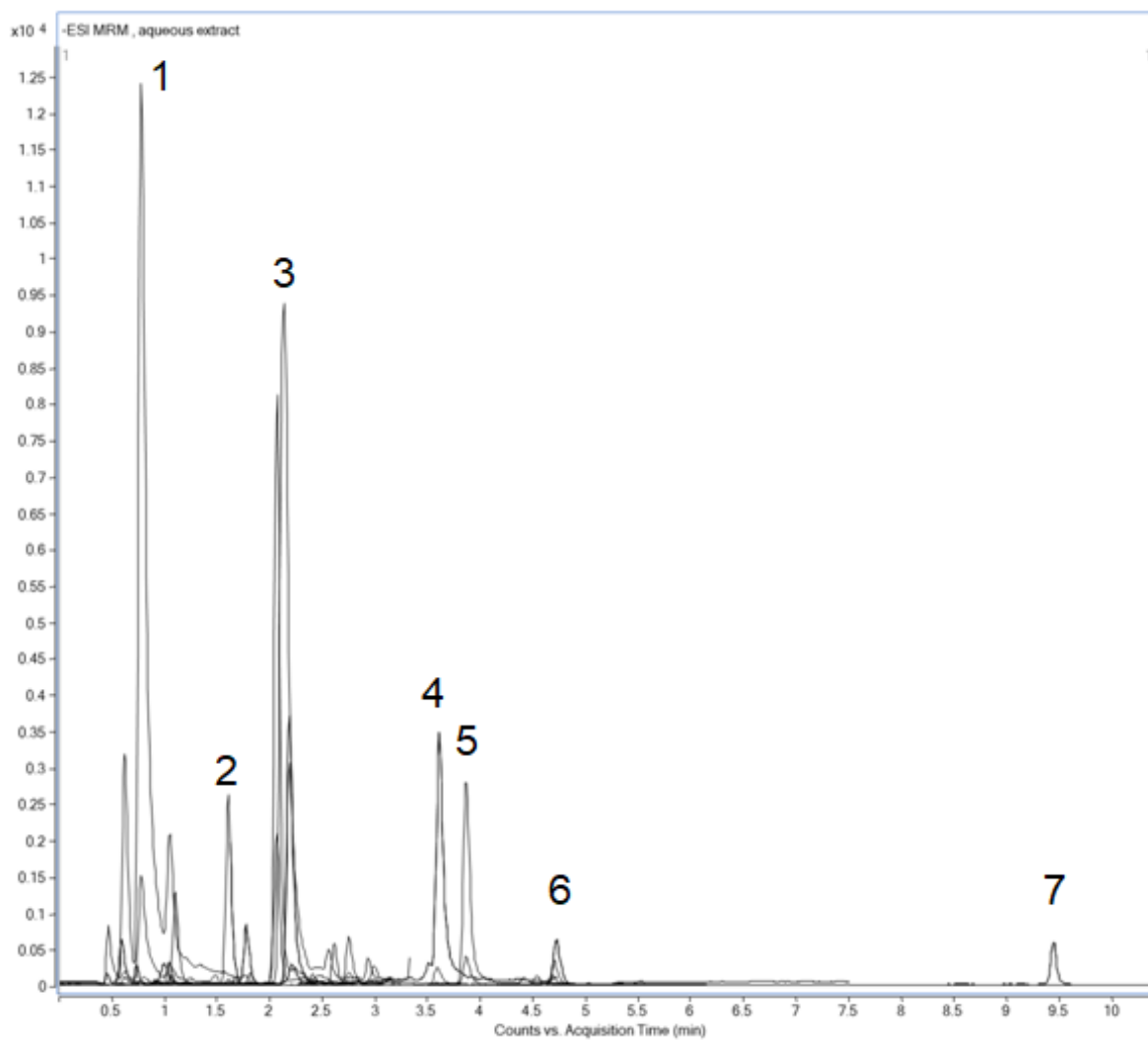
4.2.1. Одабрана једињења у екстрактима ивањског цвећа

НРРС хроматограми метанолског, воденог и ацетонског екстракта надземног дела *G. verum* приказани су на сликама 6,7 и 8. НРРС анализа открила је да су најзаступљенија једињења у метанолском екстракту: хлорогенска киселина, цинарозид (лутеолин-7-О-глукозид), кверцетин-3-О-глукозид, кверцетин, лутеолин, изорамнетин и урсолна киселина. У воденом екстракту једињења која су била у највишем проценту заступљена су: хлорогенска киселина, р-кумаринска киселина, цинарозид (лутеолин-7-О-глукозид), кверцетин, лутеолин, изорамнетин и урсолна киселина. Додатно, доминантно место у ацетонском екстракту заузимају следећи биомолекули: хлорогенска киселина, цинарозид (лутеолин-7-О-глукозид), кверцетин-3-О-глукозид, кверцетин, лутеолин, изорамнетин и

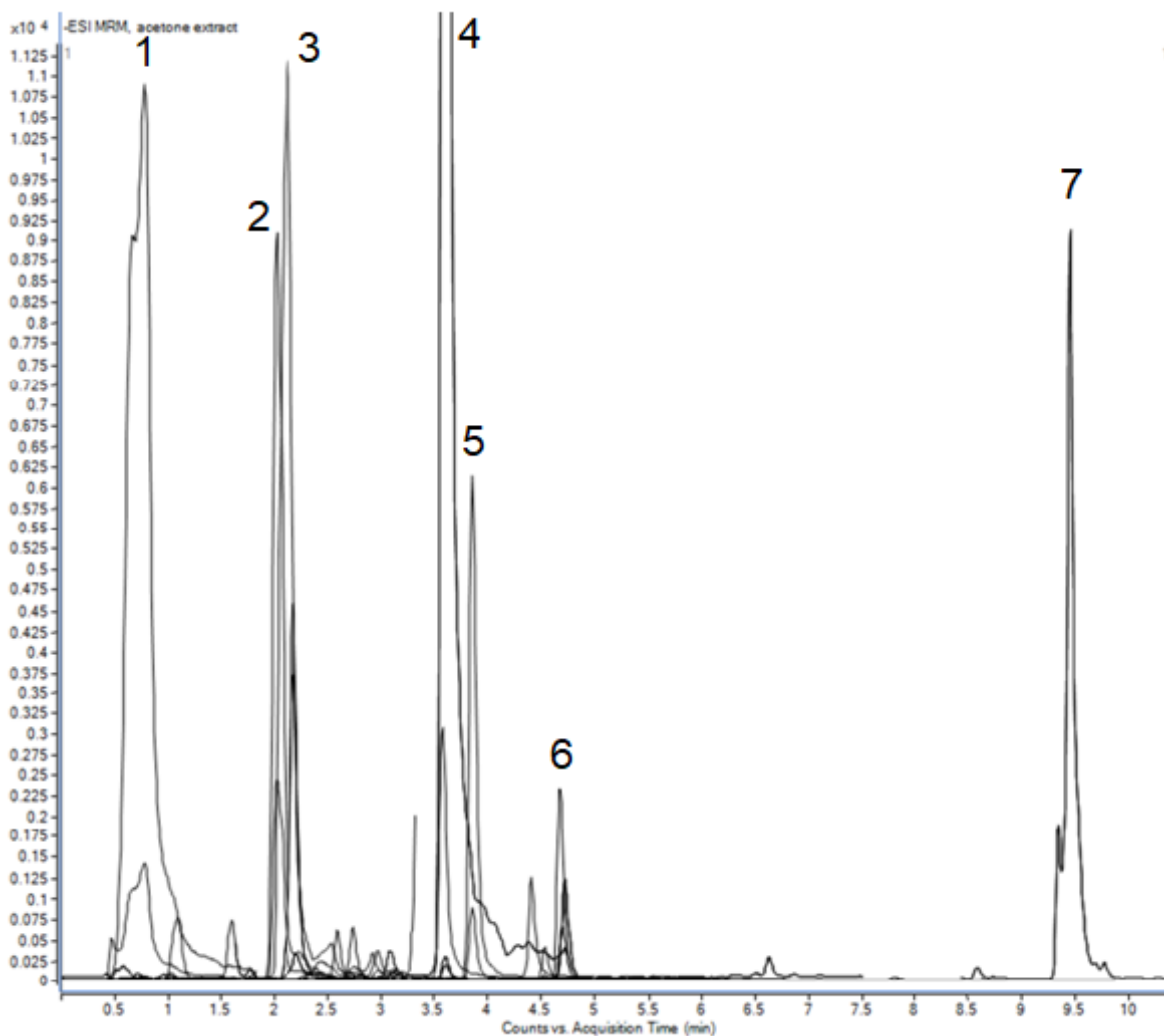
урсолна киселина. Хлорогенска киселина се истиче по највећој концентрацији у свим испитиваним екстрактима.



Слика 6. HPLC хроматограм метанолског екстракта *G. verum*: једињење 1- хлорогенска киселина; једињење 2- цинарозид; једињење 3- кверцетин-3-О-глукозид; једињење 4- кверцетин; једињење 5- лутеолин; једињење 6- изорамнетин; једињење 7- урсолна киселина.



Слика 7. HPLC хроматограм воденог екстракта *G. verum*: једињење **1**- хлорогенска киселина; једињење **2**- р-кумаринска киселина; једињење **3**- цинарозид; једињење **4**- кверцетин; једињење **5**- лутеолин; једињење **6**- изорамнетин; једињење **7**- урсолна киселина.



Слика 8. HPLC хроматограм ацетонског екстракта *G. verum*: једињење 1- хлорогенска киселина; једињење 2- цинарозид; једињење 3- кверцетин-3-О-глукозид; једињење 4- кверцетин; једињење 5- лутеолин; једињење 6- изорамнетин; једињење 7- урсолна киселина.

Табела 8. Квантитативна и квалитативна анализа индивидуалних једињења из екстракта надземног дела *G. verum* изражена као $\mu\text{g/g}$ сувог екстракта

| | Име једињења | Ацетонски екстракт | Метанолски екстракт | Водени екстракт | Ретенционо време [tr] |
|-----|-------------------------------------|--------------------|---------------------|-----------------|-----------------------|
| 1. | Урсолна киселина | 5376 ± 35 | 8900 ± 58 | 30,3 ± 0,2 | 9,5 |
| 2. | Хлорогена киселина | 20368 ± 1018 | 15561 ± 778 | 27420 ± 1371 | 0,8 |
| 3. | Изокверцетин | 6900 ± 207 | 6873 ± 206 | 290 ± 8,7 | 2,25 |
| 4. | Цинарозид | 6918 ± 207 | 9612 ± 288 | 5032 ± 151 | 2,13 |
| 5. | Кверцетин | 145,6 ± 43,7 | 179,1 ± 53,7 | 12,2 ± 3,7 | 3,74 |
| 6. | <i>p</i> -кумаринска киселина | 44,9 ± 4,0 | 54,3 ± 4,9 | 137,6 ± 12,4 | 1,69 |
| 7. | Астрагалин | 72,4 ± 2,9 | 93,8 ± 3,8 | 63,7 ± 2,5 | 2,8 |
| 8. | Кафеинска киселина | 24,2 ± 1,7 | 19,6 ± 1,4 | 22,6 ± 1,6 | 1,18 |
| 9. | Ферулинска киселина | 15,8 ± 1,6 | 17,3 ± 1,7 | 38,8 ± 3,9 | 1,9 |
| 10. | Лутеолин | 19,7 ± 1,0 | 33,9 ± 1,7 | 10,0 ± 0,5 | 4,03 |
| 11. | Изорамнетин | 38,5 ± 2,3 | 60,2 ± 3,6 | 2,2 ± 0,1 | 4,79 |
| 12. | Апигетрин | 22,5 ± 1,1 | 45,8 ± 2,3 | 15,5 ± 0,8 | 2,81 |
| 13. | Vanillic acid | 15,9 ± 4,8 | 14,7 ± 4,4 | 14,5 ± 4,4 | 1,24 |
| 14. | <i>p</i> -хидроксибензоева киселина | 10,6 ± 0,6 | 8,0 ± 0,5 | 26,7 ± 1,6 | 1,08 |
| 15. | Кемпферол | 9,4 ± 0,6 | 7,3 ± 0,5 | 0,5 ± 0,04 | 4,55 |
| 16. | Хеспетин | 12,9 ± 0,2 | 14,4 ± 0,4 | 1,0 ± 0,05 | 444 |
| 17. | Протокатехинска киселина | 1,9 ± 0,2 | 1,8 ± 0,1 | 3,1 ± 0,2 | 0,79 |
| 18. | Рамнетин | < 5,28 | < 4,89 | < 4,89 | 5,84 |
| 19. | Диосметин | 6,1 | 12,4 | 2,9 | 5,02 |
| 20. | Рузмаринска киселина | 1,9 | 0,3 | 1,4 | 2,43 |
| 21. | Ализарин | < 2,6 | < 2,44 | < 2,44 | 5,95 |
| 22. | Апиин | < 0,16 | < 0,16 | < 0,16 | 2,6 |
| 23. | Бајкалин | < 0,16 | < 0,16 | < 0,16 | 3,4 |
| 24. | Епигалокатехин галат | < 0,65 | < 0,61 | < 0,61 | 0,81 |
| 25. | Епикатехин | < 0,65 | < 0,61 | < 0,61 | 0,95 |
| 26. | Глициризин | < 0,16 | < 0,16 | < 0,16 | 7,41 |
| 27. | Хиперозид | < 0,32 | < 0,31 | < 0,31 | 2,16 |
| 28. | Катехин | < 0,65 | < 0,61 | < 0,61 | 0,74 |
| 29. | Мирицетин | < 20,85 | < 19,55 | < 19,55 | 2,67 |
| 30. | <i>o</i> -кумаринска киселина | < 0,16 | < 0,16 | < 0,16 | 2,62 |
| 31. | Рутин | < 0,16 | < 0,16 | < 0,16 | 2,33 |
| 32. | Глициретинска киселина | < 0,32 | < 0,31 | < 0,31 | 8,93 |
| 33. | Елагна киселина | < 0,32 | < 0,31 | 0,6 ± 0,01 | 2,61 |
| 34. | Кверцитрин | < 0,16 | < 0,16 | < 0,16 | 2,75 |
| 35. | Витексин | < 0,16 | < 0,16 | 0,3 ± 0,02 | 1,9 |

4.2.2. Садржај укупних фенола и флавоноида у екстрактима

Укупни садржај фенола био је највећи у воденом, а најмањи у метанолском екстракту ивањског цвећа. Додатно највећи садржај флавоноида откривен је у метанолском, а најмањи у ацетонском екстракту. Резултати су приказани у табели 9.

Табела 9. Укупни садржај фенола и флавоноида у екстрактима ивањског цвећа

| | Метанолни екстракт | Водени екстракт | Ацетонски екстракт |
|--|--------------------|------------------------------|------------------------------|
| Укупни садржај фенола ^a | 27.34 ± 2.12 | 127.57 ± 11.25 ^{§§} | 101.58 ± 7.96 ^{**#} |
| Укупни садржај флавоноида ^b | 67.11 ± 4.13 | 61.24 ± 6.11 [§] | 30.51 ± 3.37 ^{**##} |

^amg еквивалента галне киселине (EGA)/g CE; ^bmg еквивалента кверцетина (EQU)/g CE; CE-суви екстракт; приказана је средња вредности три мерења ± стандардна девијација (X ± SD). **статистички значајна разлика на нивоу p < 0,01 приликом поређења ацетонског и метанолног екстракта; #статистички значајна разлика на нивоу p < 0,05 приликом поређења ацетонског и воденог екстракта; ##статистички значајна разлика на нивоу p < 0,01 приликом поређења ацетонског и воденог екстракта; §статистички значајна разлика на нивоу p < 0,05 приликом поређења метанолног и воденог екстракта; §§статистички значајна разлика на нивоу p < 0,01 приликом поређења метанолног и воденог екстракта.

4.3. Капацитет неутралисања DPPH· радикала испитиваних екстраката

Резултати испитивања *in vitro* антиоксидационе активности екстраката ивањског цвећа указују да највећи потенцијал неутрализације DPPH· поседује метанолски, након чега се истиче водени екстракт. С друге стране, активност ацетонског екстракта била је

статистички значајно нижа у поређењу са метанолским и воденим ($p < 0,05$). Резултати капацитета неутралисања DPPH· су изражени као EC50 вредности и приказани у табели 10.

Табела 10. Капацитет неутралисања DPPH· радикала испитиваних екстраката

| Узорак | IC50 ^a (µg/mL) |
|---------------------|-------------------------------|
| Водени екстракт | 8,78 ± 0.10 |
| Метанолски екстракт | 9,63 ± 0.32 |
| Ацетонски екстракт | 11,65 ± 1.16** # |
| ВНТ | 11.65 ± 1.144 ^{§§} ¶ |

Свака вредност је приказана као средња вредности три мерења ± стандардна девијација ($X \pm SD$); ВНТ -бутиловани хидрокситолуен. **статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ приликом поређења ацетонског и метанолског екстракта; #статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ приликом поређења ацетонског и воденог екстракта; §§статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ приликом поређења метанолског екстракта и ВНТ; ¶статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ приликом поређења воденог екстракта и ВНТ; ¶¶статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ приликом поређења воденог екстракта и ВНТ;

4.4. Антимикробна активност екстраката ивањског цвећа

In vitro испитивање антимикробне активности екстраката ивањског цвећа спроведено је на 10 врста патогених бактерија и 10 врста гљива. Резултати МИК и ММК вредности одговарајућих екстраката, као и доксицилина и флуконазола као позитивних контрола приказани су у табели 11.

Интензитет антимикробне активности варирао је у зависности од тестираног микроорганизма и типа екстракта. МИК вредности за испитиване екстракте налазиле су се у опсегу од $< 0,078$ до 5 mg/mL. Највећу осетљивост показала је бактерија *Bacillus subtilis* ATCC 6633 са вредности МИК $< 0,078$ mg/mL за метанолски и ацетонски и 0,313 mg/mL за водени екстракт. Изражена антибактеријска активност свих тестираних екстраката уочена

је према бактеријама *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и *Salmonella enterica* са вредностима МИК 1,25 mg/mL.

Антигљивична активност испитиваних екстраката била је генерално слаба, а добијени резултати су приказани у табели 12. Сви испитивани екстракти испољили су умерену и нижу активност према већини квасаца и филаментозних гљива у односу на позитивну контролу. Изузетак је уочен код ацетонског екстракта према врсти *Aspergillus niger* ATCC 16404 са вредности МИК 0,625 mg/mL, чија је антигљивична активност била виша у односу на флуконазол.

Табела 11. Антибактеријска активност екстраката ивањског цвећа

| Тип екстракта | Водени | | Метанолски | | Ацетонски | | Доксициклин | |
|--|--------|------|------------|-------|-----------|--------|-------------|-------|
| | МИК | ММК | МИК | ММК | МИК | ММК | МИЦ | ММК |
| Врста | МИК | ММК | МИК | ММК | МИК | ММК | МИЦ | ММК |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 5 | 10 | 5 | 5 | 2,5 | 2,5 | 0,448 | 7,81 |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | 1,25 | 1,25 | 1,25 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 0,22 | 3,75 |
| <i>Bacillus cereus</i> | 5 | 10 | 5 | 5 | 2,5 | 2,5 | 0,977 | 7,81 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 5 | 10 | 2,5 | 5 | 5 | 5 | 0,112 | 1,953 |
| <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 | 0,31 | 1,25 | <0,078 | 0,313 | <0,078 | <0,078 | 1,953 | 31,25 |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 2,5 | 5 | 2,5 | 2,5 | 5 | 10 | 15,63 | 31,25 |
| <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 5 | 5 | 15,63 | 62,5 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | 5 | 10 | 5 | 5 | 5 | 5 | 62,5 | 125 |
| <i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 29544 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | / | / |
| <i>Salmonella enteric</i> | 1,25 | 5 | 1,25 | 2,5 | 1,25 | 5 | 15,63 | 31,25 |

МИК-минимална инхибиторна концентрација ($\mu\text{g}/\text{mL}$); ММК-минимална микробицидна концентрација ($\mu\text{g}/\text{mL}$); нт-није тестирано. Позитивна контроле је доксициклин.

Табела 12. Антигљивична активност екстракта ивањског цвећа

| Тип екстракта | Водени | | Метанолски | | Ацетонски | | Флуконазол | |
|---------------------------------------|--------|-----|------------|-----|-----------|-----|------------|-------|
| | МИК | ММК | МИК | ММК | МИК | ММК | МИК | ММК |
| Врста | | | | | | | | |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | 5 | 10 | 5 | >10 | 2,5 | 10 | 31,25 | 500 |
| <i>Saccharomyces boulardii</i> | >10 | >10 | >10 | >10 | >10 | >10 | 7,81 | 31,25 |
| <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 | 2,5 | 5 | 2,5 | >10 | 5 | >10 | 31,25 | 62,5 |
| <i>Penicillium expansum</i> | 10 | >10 | 5 | 10 | 10 | 10 | / | / |
| <i>P. chrysogenum</i> | 10 | >10 | 5 | 10 | 10 | 10 | 1000 | 1000 |
| <i>P. italicum</i> | 10 | >10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 250 | 500 |
| <i>Trichoderma viridae</i> ATCC 13233 | 10 | 10 | 5 | 10 | 5 | 10 | 500 | 1000 |
| <i>Aspergillus flavus</i> ATCC 9170 | >10 | >10 | 10 | >10 | 5 | 10 | 500 | 500 |
| <i>A. fumigatus</i> ATTC 204305 | >10 | >10 | 10 | >10 | 5 | >10 | 1000 | 1000 |
| <i>A. niger</i> ATCC 16404 | 10 | >10 | 5 | 10 | 0,625 | 5 | 1000 | 1000 |

МИК-минимална инхибиторна концентрација ($\mu\text{g}/\text{mL}$); ММК-минимална микробицидна концентрација ($\mu\text{g}/\text{mL}$), нт-није тестирано. Позитивна контроле је флуконазол.

4.5. Антибиофилм активност екстраката ивањског цвећа

Испитивање *in vitro* антибиофилм активности спроведно је на 2 врсте бактерија и резултати су приказани у табели 13. Водени екстракт је испољио снажнији ефекат од метанолског и ацетонског екстракта на инхибицију формирања биофилма *B. subtilis* ATCC 6633 и *P. mirabilis* ATCC 12453. Наиме није уочена значајна активност метанолског и ацетонског екстракта у тестираним концентрацијама. Ефикасност воденог екстракта у формирању биофилма *B. subtilis* ATCC 6633 и *P. mirabilis* ATCC 12453 уочена је при концентрацији од 5 mg/ml. Додатно водени екстракт је испољио активност према формираном биофилму *P. mirabilis* ATCC 12453 при концентрацији од 5,47 mg/ml.

Табела 13. Антибиофилм активност екстраката ивањског цвећа

| Тип екстракта | Формирање биофилма | | | Формирани биофилм | | | |
|--------------------------------|--------------------|------------|-----------|-------------------|------------|-----------|-------------|
| | Водени | Метанолски | Ацетонски | Водени | Метанолски | Ацетонски | Тетрациклин |
| Врста микроорганизма | БИК ₅₀ | | | | | | |
| <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 | 5 | > 10 | > 10 | > 10 | >10 | > 10 | <15.6 |
| <i>P. mirabilis</i> ATCC 12453 | 5 | > 10 | > 10 | 5.47 | > 10 | > 10 | 156 |

*БИЦ–минимална биофилм инхибиторна концентрација при којој је дошло до 50% инхибиције- за биљне екстракте изражена је у mg/mL, док је за антибиотик у µg/mL.

4.6. Антиинфламациона активност екстраката ивањског цвећа

Метанолни екстракт ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg и 250 mg/kg испољио је значајну ($p < 0,05-0,01$) инхибицију едема шапе пацова након 1., 2., 3. и 4. сата од апликације карагенина у односу на контролну групу. Додатно, најнижа доза довела је до значајне инхибиције едема шапе након 2., 3. и 4. сата од примене карагенина.

Међутим индометацин је изазвао процентуално веће снижење едема шапе у односу на све третиране и контролну групу у 2., 3. и 4. сату.

Табела 14. Утицај екстракта ивањског цвећа на смањење дебљине шапе пацова

| Повећање дебљине шапе пацова (mm) (% инхибиције) | | | | |
|--|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Групе | 1h | 2h | 3h | 4h |
| Контрола | 0,9 ± 0,02 | 1,88 ± 0,11 | 2,46 ± 0,23 | 2,1 ± 0,17 |
| Индометацин | 0,79 ± 0,01 (12,2) | 1,01 ± 0,12** (46,81) | 1,16 ± 0,04** (52,77) | 0,9 ± 1,3** (57,14) |
| 50 GVE | 0,84 ± 0,01 (6,7) | 1,56 ± 0,13* (17,02) | 2,18 ± 0,23* (11,38) | 1,56 ± 1,13** (25,71) |
| 100 GVE | 0,75 ± 0,04* (16,6) | 1,22 ± 0,3** (35,1) | 1,78 ± 0,12** (27,64) | 1,56 ± 0,2** (26,62) |
| 200 GVE | 0,4 ± 0,03* (33,3) | 1,1** ± 0,4 (41,49) | 1,67 ± 0,2** (32,25) | 1,4 ± 0,3** (33,3) |

Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација (X ± SD);

*статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на контролну групу;

**статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ у односу на контролну групу.

4.7. Ефекти екстракта ивањског цвећа на морфометријске карактеристике пацова

4.7.1. Ефекти екстракта ивањског цвећа на телесну масу животиња

На почетку експерименталног протокола све здраве животиње укључене у студију биле су телесне масе 210 ± 40 g, док су спонтано-хипертензивне животиње тежиле 150 ± 30 g. Након четворонедељног третмана екстрактима ивањског цвећа уочен је пораст телесне масе у односу на први дан експерименталног периода код свих животиња. Поредили смо телесну масу здравих нетретираних животиња са спонтано-хипертензивним нетретираним, као и здраве и спонтано-хипертензивне пацове који су примали исту дозу екстракта (CTRL vs SHR, 500 GVE vs SHR + 500 GVE, 250 GVE vs SHR + 250 GVE и 125 vs SHR + 125 GVE). Уочили смо да је телесна маса здравих

животиња била значајно виша у односу на спонтано-хипертензивне животиње у свим групама. Међутим након 28 дана терапијског протокола нису забележене статистички значајне разлике у вредностима телесне масе између здравих нетретираних и здравих пацова на третману екстрактима ивањског цвећа. Такође конзумација екстраката ивањског цвећа није значајно утицала на промену телесне масе, ни у смислу њеног прираста нити губитка, код SHR пацова.

4.7.2. Ефекти екстраката ивањског цвећа на масу срца, јетре и бубрега животиња

Непосредно након жртвовања животиња изоловани су бубрег, јетра и срце и измерена је њихова апсолутна маса. Израчуната је и релативна маса органа која представља однос апсолутне масе органа (mg) и телесне масе животиње (g). За статистичку анализу ефеката екстраката ивањског цвећа на морфометријске карактеристике користили смо вредности релативне масе. Поредили смо релативну масу срца, бубрега и јетре здравих нетретираних животиња са спонтано-хипертензивним нетретираним, као и здравих и спонтано-хипертензивних пацове који су примали исту дозу екстракта. Резултати указују да је релативна маса срца већа код свих група SHR у односу на здраве пацове, а значајни скок је уочен у SHR + 250 GVE групи у односу на SHR + 125 GVE групу.

Када је реч о релативној маси бубрега она је била виша код SHR и SHR + 500 GVE у односу на CTRL и 500 GVE. Релативна маса јетре је била нижа у SHR у односу на CTRL и виша у SHR + 250 GVE у односу на 250 GVE. У групи 250 GVE уочено је снижење у односу на CTRL, док у групи хипертензивних није било статистички значајних разлика између група.

Табела 15. Ефекти ивањског цвећа на телесну масу пацова и апсолутне масе срца, бубрега и јетре

| | ТМ (g) | МС (g) | МБ(g) | МЈ (g) |
|----------------------|---------------------------|-------------|-------------|--------------|
| CTRL | 319,83 ± 21,23 | 1,13 ± 0,04 | 0,9 ± 0,09 | 13,2 ± 0,15 |
| 500 GVE | 336,75 ± 37,78 | 1,25 ± 0,1 | 0,91 ± 0,1 | 13,05 ± 0,2 |
| 250 GVE | 356 ± 19,6 | 1,21 ± 0,5 | 1,01 ± 0,76 | 11,64 ± 0,87 |
| 125 GVE | 340,23 ± 15,6 | 1,22 ± 0,07 | 1,02 ± 0,23 | 12,9 ± 2,1 |
| SHR | 210 ± 15* | 0,94 ± 0,08 | 0,65 ± 0,09 | 6,890 ± 0,9 |
| SHR + 500 GVE | 205,6 ± 14,9 ^α | 1,01 ± 0,01 | 0,61 ± 0,03 | 7,36 ± 0,87 |
| SHR + 250 GVE | 203,2 ± 15,3 ^β | 1,05 ± 0,07 | 0,62 ± 0,04 | 8,08 ± 0,02 |
| SHR + 125 GVE | 215,2 ± 10 ^γ | 1,02 ± 0,04 | 0,63 ± 0,02 | 7,78 ± 0,012 |

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X±SD).

*Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на CTRL групу; ^αСтатистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на 500 mg/kg групу; ^βСтатистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на 500 mg/kg групу; ^γСтатистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на 500 mg/kg групу; ТМ- телесна маса; МС- маса срца; МБ- маса бубрега; МЈ- маса јетре;

Табела 16. Ефекти ивањског цвећа на релативну масу срца, бубрега и јетре

| | МС/ТМ | МБ/ТМ | МЈ/ТМ |
|----------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| CTRL | 353,31 | 281,4 | 4127,19 |
| 500 | 371,20 | 270,23 | 3875,28 |
| 250 | 339,89 | 283,71 | 3269,66* |
| 125 | 358,58 | 299,80 | 3791,55 |
| SHR | 447,62* | 309,52* | 3280,95* |
| 500 SHR | 491,25 ^α | 296,69 ^α | 3579,77 |
| 250 SHR | 516,73 ^β | 305,13 | 3976,38 ^β |
| 125 SHR | 473,98 ^γ | 292,75 | 3534,76 |

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X±SD).

*Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на CTRL групу; ^αСтатистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на 500 GVE групу; ^βСтатистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на 250 GVE групу; ^γСтатистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на 125 GVE групу; ^δСтатистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на SHR + 125 GVE групу; МС/ТМ – однос масе срца и телесне масе; МБ/ТМ – однос масе срца бубрега и телесне масе; МЈ/ТМ – однос масе јетре и телесне масе;

4.8. Ефекти екстраката ивањског цвећа на маркере оксидационог стреса у крви пацова

4.8.1. Ефекти екстраката ивањског цвећа на системски редокс статус здравих пацова

4.8.1.1. Ефекти екстраката ивањског цвећа на прооксидационе параметре мерене у крви здравих пацова

Промене прооксидационих параметара O_2^- , H_2O_2 , NO_2^- и TBARS мерених у плазми пацова на третману екстрактима у дози од 500 mg/kg, 250 mg/kg и 125 mg/kg као и нетретираних пацова приказане су табеларно и графички (Табела 17, График 1). Вредности параметара су изражене као средња вредност + стандардна девијација ($X \pm SD$) са статистички значајном разликом за вредност $p < 0,05$.

Сви испитивани прооксидациони маркери били су статистички значајно нижи у групи која је била на третману највишом дозом, док је примена екстракта у дози од 250 mg/kg смањила концентрације O_2^- , H_2O_2 и TBARS у односу на контролне услове. Најнижа доза екстракта довела је до смањења концентрације O_2^- и H_2O_2 . Такође ниже вредности O_2^- , H_2O_2 и TBARS биле су забележене након третмана екстрактом у дози од 500 mg/kg у односу на 125 mg/kg, док је концентрација H_2O_2 била нижа у групи на третману највишом у односу на средњу дозу екстракта. Није било разлика у вредностима наведених параметара у групи која је користила средње и најниже дозе.

Табела 17. Ефекти примене екстракта ивањског цвећа на пооксидационе параметре (O_2^- , H_2O_2 , NO_2^- и TBARS) у плазми здравих пацова

| | TBARS ($\mu\text{mol/ml}$) | NO_2^- (nmol/ml) | O_2^- (nmol/ml) | H_2O_2 (nmol/ml) |
|----------------|------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| CTRL | $0,98 \pm 0,09$ | $2,8 \pm 0,1$ | $1,36 \pm 0,22$ | $3,2 \pm 0,32$ |
| 500 GVE | $0,38 \pm 0,03$ | $2,39 \pm 0,12$ | $1,1 \pm 0,15$ | $2,36 \pm 0,23$ |
| 250 GVE | $0,51 \pm 0,08$ | $2,42 \pm 0,11$ | $1,16 \pm 0,16$ | $2,54 \pm 0,25$ |
| 125 GVE | $0,68 \pm 0,05$ | $2,56 \pm 0,31$ | $1,17 \pm 0,1$ | $2,59 \pm 0,13$ |

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

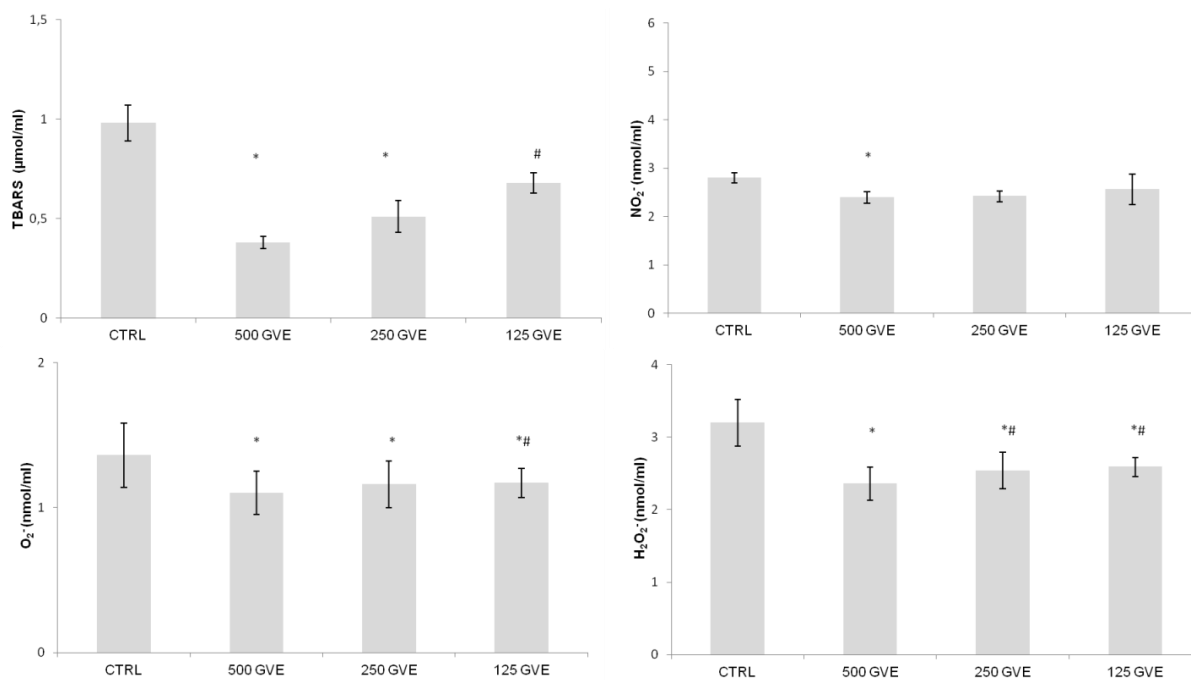


График 1. Прооксидациони параметри (O_2^- , H_2O_2 , NO_2^- и TBARS) мерени у плазми здравих пацова на третману екстрактима у дози од 500 mg/kg, 250 mg/kg и 125 mg/kg као и нетретираних здравих пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). *Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на CTRL групу; #Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на 500 GVE;

4.8.1.2. Ефекти екстраката ивањског цвећа на антиоксидационе параметре мерене у крви здравих пацова

Промене антиоксидационих параметара SOD, CAT и GSH мерених у лизату еритроцита здравих пацова на третману екстрактима у дози од 500 mg/kg, 250 mg/kg и 125 mg/kg као и нетретираних пацова приказане су табеларно и графичи (Табела 18, График 2). Вредности параметара су изражене као средња вредност + стандардна девијација ($X \pm SD$) са статистички значајном разликом за вредност $p < 0,05$.

Активност SOD је била значајно повишена у групи која је била на третману екстрактом у дози од 500 mg/kg и 250 mg/kg у односу на нетретиране животиње. Значајно нижа активност овог ензима забележена је у групи која је користила најнижу дозу (250 GVE) у односу на средњу дозу (125 GVE). Сличне вредности CAT и GSH биле су присутне у свим групама здравих животиња.

Табела 18. Ефекти примене екстраката ивањског цвећа на антиоксидационе параметре (SOD, CAT и GSH) мерене у лизату еритроцита здравих пацова

| | SOD (U/g Hb x 10 ³) | CAT (U/g Hb x 10 ³) | GSH (nmol/ml RBC) |
|----------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| CTRL | 16,5 ± 2,8 | 7,6 ± 0,5 | 89560 ± 4500 |
| 500 GVE | 25,8 ± 1,6 | 8,4 ± 0,9 | 92005 ± 5200 |
| 250 GVE | 22,3 ± 2,5 | 8,7 ± 0,5 | 93045 ± 2500 |
| 125 GVE | 19,8 ± 3,1 | 8,9 ± 0,6 | 92748 ± 2110 |

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$).

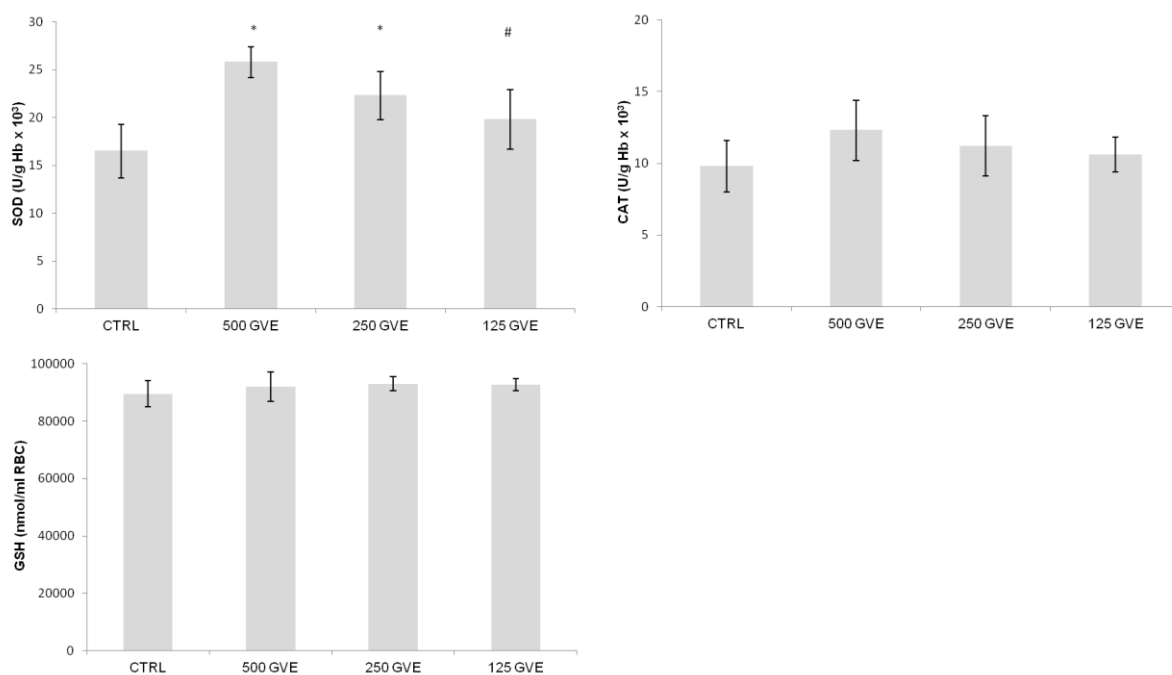


График 2. Антиоксидациони параметри (SOD, CAT и GSH) мерени у лизату еритроцита здравих пацова на третману екстрактима у дози од 500 mg/kg, 250 mg/kg и 125 mg/kg као и нетретираних здравих пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). *Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на CTRL групу; #Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку 500 GVE групу;

4.8.2. Ефекти екстракта ивањског цвећа на системски редокс статус спонтано-хипертензивних пацова

4.8.2.1. Ефекти екстракта ивањског цвећа на прооксидационе параметре мерене у крви спонтано-хипертензивних пацова

Промене прооксидационих параметара O_2^- , H_2O_2 , NO_2^- и TBARS мерених у плазми спонтано-хипертензивних пацова на третману екстрактима у дози од 500 mg/kg, 250 mg/kg и 125 mg/kg као и нетретираних спонтано-хипертензивних пацова приказане су табеларно и графички (Табела 19, График 3).

Примена екстракта у дози од 500 и 250 mg/kg довела је до снижења свих биомаркера оксидационог стреса, док је доза од 125 mg/kg довела до пада у концентрацијама H_2O_2 и TBARS у односу на нетретиране спонтано-хипертензивне животиње. Вредности O_2^- и H_2O_2 су биле значајно ниже у групи на третману највишом у односу на најнижу дозу.

Табела 19. Ефекти примене екстракта ивањског цвећа на прооксидационе параметре (O_2^- , H_2O_2 , NO_2^- и TBARS) у плазми спонтано-хипертензивних пацова

| | TBARS ($\mu\text{mol/ml}$) | NO_2^- (nmol/ml) | O_2^- (nmol/ml) | H_2O_2 (nmol/ml) |
|----------------------|------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| SHR | 1,69 \pm 0,05 | 4,15 \pm 0,01 | 3,8 \pm 0,42 | 4,56 \pm 0,15 |
| SHR + 500 GVE | 1,13 \pm 0,06 | 3,77 \pm 0,3 | 3,12 \pm 0,31 | 3,68 \pm 0,17 |
| SHR + 250 GVE | 1,22 \pm 0,07 | 3,75 \pm 0,12 | 3,23 \pm 0,62 | 3,97 \pm 0,19 |
| SHR + 125 GVE | 1,25 \pm 0,08 | 4,09 \pm 0,1 | 3,31 \pm 0,54 | 4,1 \pm 0,31 |

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

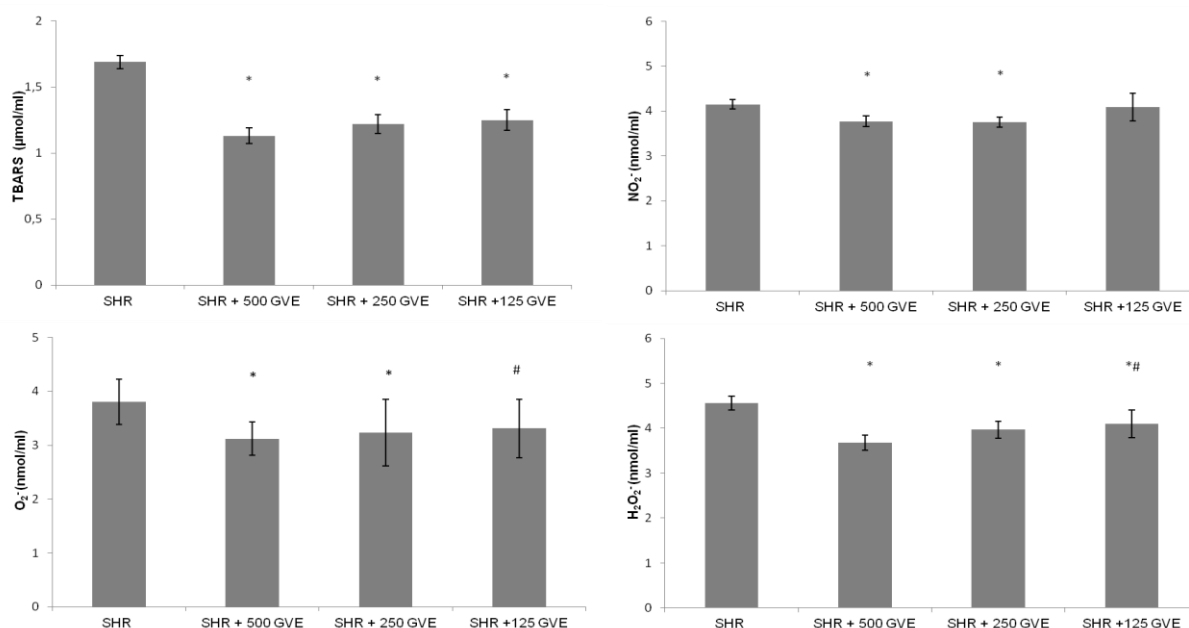


График 3. Прооксидациони параметри (O_2^- , H_2O_2 , NO_2^- и TBARS) мерени у плазми спонтано-хипертензивних пацова на третману екстрактима у дози од 500 mg/kg, 250 mg/kg и 125 mg/kg као и нетретираних спонтано-хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). *Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на SHR групу; #Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на SHR + 500 GVE;

4.8.2.2. Ефекти екстракта ивањског цвећа на антиоксидационе параметре мерене у крви спонтано-хипертензивних пацова

Промене антиоксидационих параметара SOD, CAT и GSH мерених у лизату еритроцита спонтано-хипертензивних пацова на третману екстрактима у дози од 500 mg/kg, 250 mg/kg и 125 mg/kg као и нетретираних хипертензивних пацова приказане су табеларно и графичи (Табела 20, График 4). Вредности параметара су изражене као средња вредност + стандардна девијација ($X \pm SD$) са статистички значајном разликом за вредност $p < 0,05$.

Активност SOD је била значајно повишена у групи која је била на третману екстрактом у дози од 500 mg/kg и 250 mg/kg у односу на нетретиране животиње. Значајно нижа активност овог ензима забележена је у групи која је користила најнижу

дозу (250 GVE) у односу на средњу дозу (125 GVE). Сличне вредности CAT и GSH биле су присутне у свим групама здравих животиња.

Табела 20. Ефекти примене екстракта ивањског цвећа на антиоксидационе параметре (SOD, CAT и GSH) мерене у лизату еритроцита спонтано-хипертензивних пацова

| | SOD (U/g Hb x 10 ³) | CAT (U/g Hb x 10 ³) | GSH (nmol/ml RBC) |
|----------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| SHR | 9,8 ± 1,8 | 4,3 ± 0,4 | 78954 ± 1592 |
| SHR + 500 GVE | 12,3 ± 2,1 | 5,1 ± 0,7 | 76523 ± 2132 |
| SHR + 250 GVE | 11,2 ± 2,6 | 4,9 ± 0,6 | 79800 ± 2593 |
| SHR + 125 GVE | 10,6 ± 1,2 | 4,87 ± 0,8 | 82002 ± 5645 |

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X±SD).

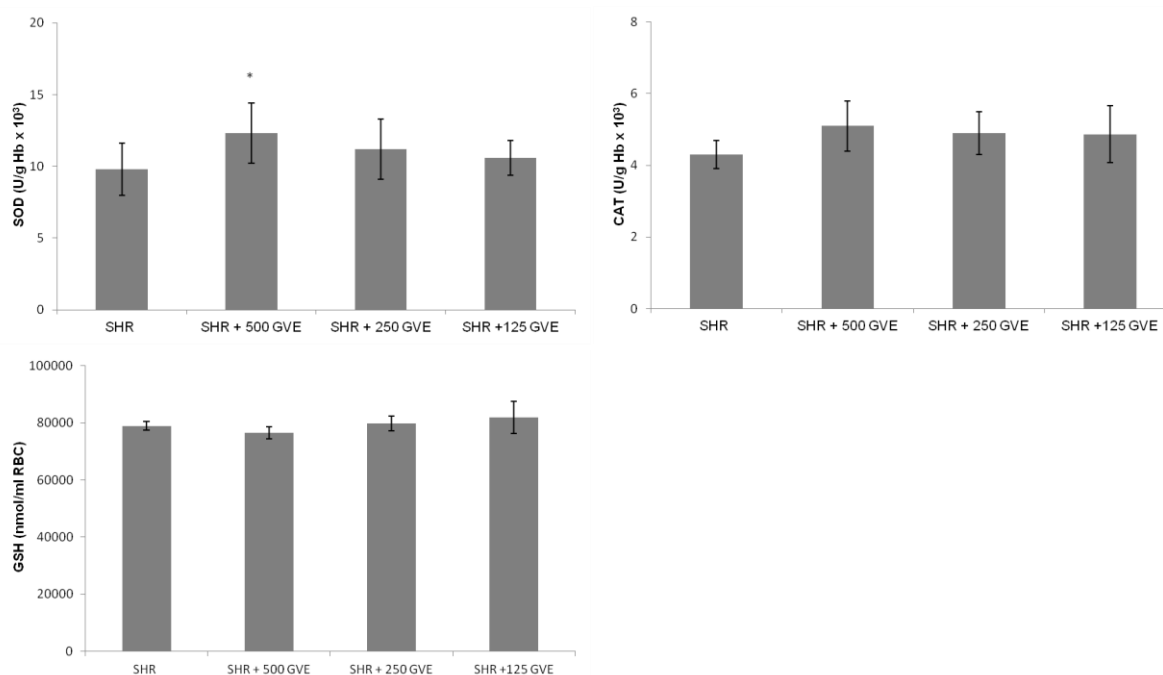


График 4. Антиоксидациони параметри (SOD, CAT и GSH) мерени у лизату еритроцита спонтано-хипертензивних пацова на третману екстрактима у дози од 500 mg/kg, 250 mg/kg и 125 mg/kg као и нетретираних здравих пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X±SD). *Статистички значајна

разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на SHR групу; #Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку SHR + 500 GVE групу.

4.8.3. Разлике у утицају екстракта ивањског цвећа на системски редокс статус здравих и спонтано-хипертензивних животиња

Разлике у прооксидантним параметрима између нетретираних здравих и спонтано-хипертензивних пацова приказане су на графику 5. Сви мерени параметри били су значајно виши у групи SHR у односу на CTRL.

Разлике у антиоксидационим параметрима између нетретираних здравих и спонтанохипертензивних пацова приказане су на графикону 6. Сви мерени параметри били су значајно нижи у групи SHR у односу на CTRL.

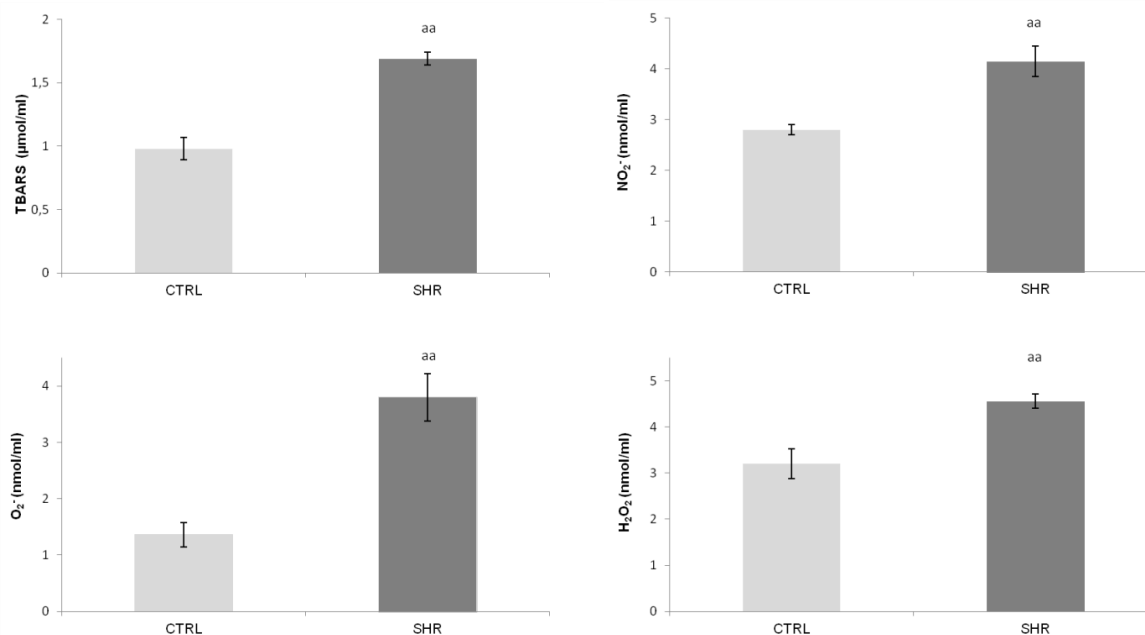
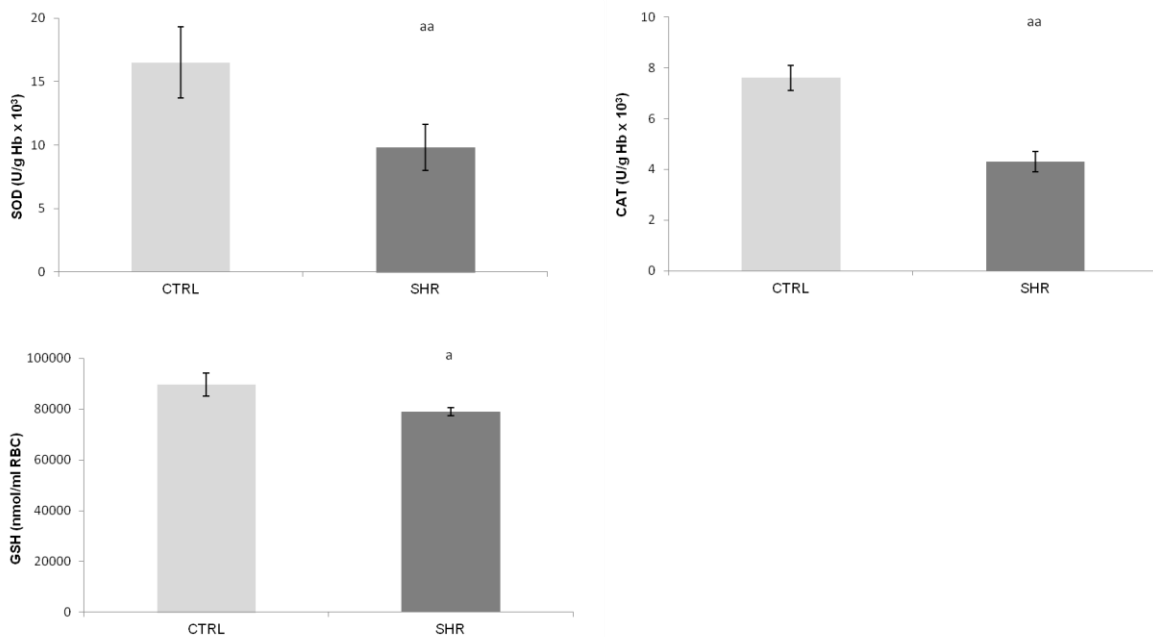


График 5. Ефекти екстракта ивањског цвећа на прооксидантне маркере у плазми здравих и спонтано-хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). ^aСтатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на CTRL групу; ^{aa}Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ у односу на CTRL групу;



Графикон 6. Ефекти екстракта ивањског цвећа на антиоксидантне маркере у плазми здравих и спонтано-хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). ^aСтатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на CTRL групу; ^{aa}Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ у односу на CTRL групу;

Разлике између ефеката екстракта ивањског цвећа на прооксидационе и антиоксидационе параметре здравих и хипертензивних пацова приказане су на графику 7 и 8. Вредности параметара су изражене као средња вредност + стандардна девијација ($X \pm SD$) са статистички значајном разликом за вредност $p < 0,05$.

Поређење је извршено између здравих и хипертензивних нетретираних пацова, као и између здравих и хипертензивних пацова који су користили исту дозу екстракта. Уочено је да су вредности свих маркера оксидационог стреса значајно више код хипертензивних пацова након примене свих доза екстракта (Графикон 7). С друге стране, вредности антиоксидационих параметара биле значајно више код здравих пацова у свим групама у односу на одговарајуће хипертензивне групе. Једино није било разлике у нивоу GSH између здравих и хипертензивних пацова на третману екстрактом у дози од 250 mg/kg (Графикон 8).

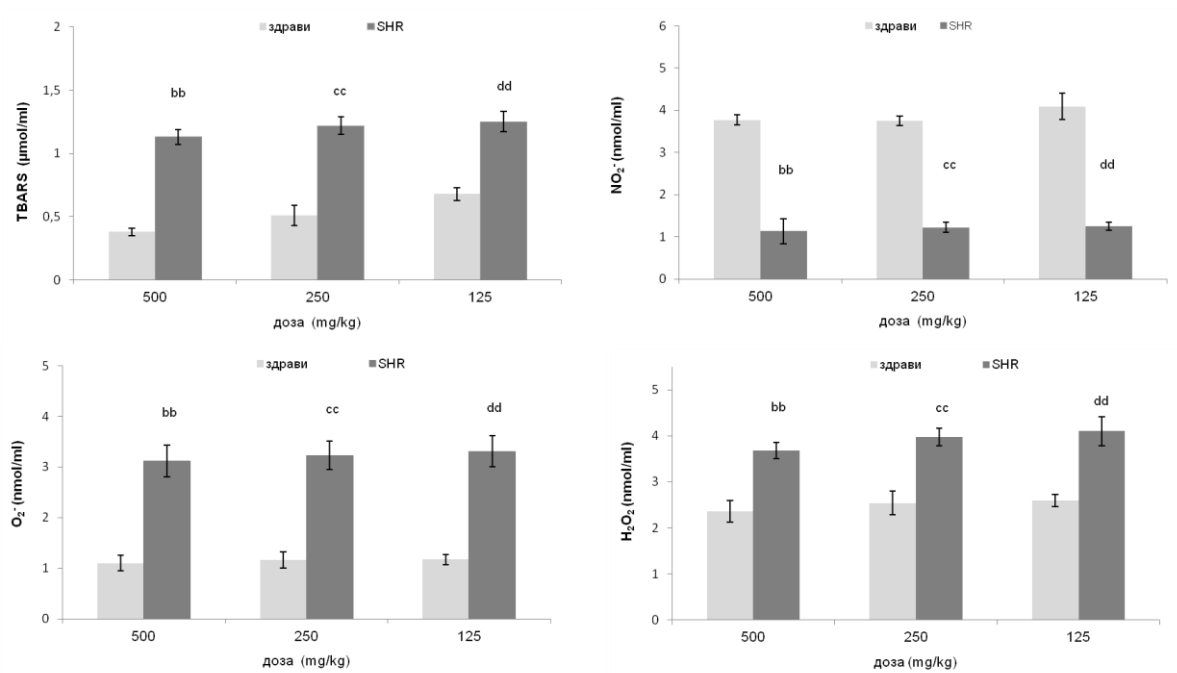


График 7. Поређење ефеката различитих доза екстракта ивањског цвећа на прооксидантне параметре здравих и спонтано-хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). ^{bb}Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ у односу на 500 GVE групу; ^{cc}Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ у односу на 250 GVE групу; ^{dd}Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ у односу на 125 GVE групу;

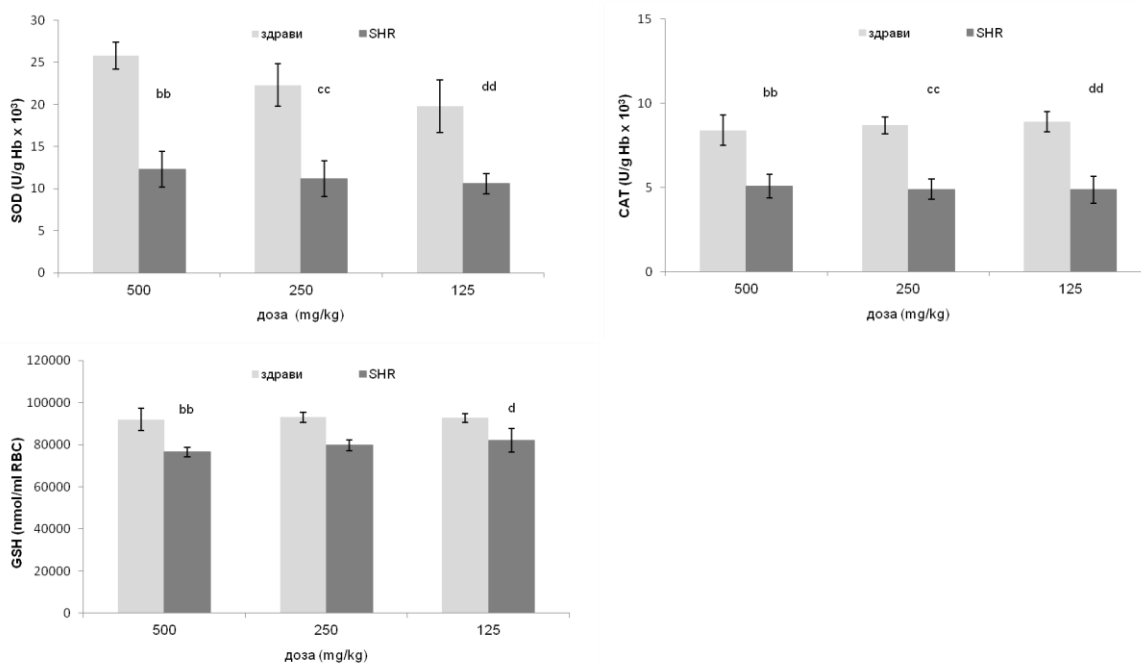


График 8. Поређење ефеката различитих доза екстракта ивањског цвећа на антиоксидантне параметре здравих и спонтано-хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). ^{bb}Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ у односу на 500 GVE групу; ^{cc}Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ у односу на 250 GVE групу; ^{dd}Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ у односу на 125 GVE групу.

4.9. Ефекти екстраката ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Вредности $dp/dt \max$, $dp/dt \min$, SLVP, DLVP, HR и CF бележене су у: тренутку стабилизације (C), у првом минути реперфузије након исхемије (P1) и на сваких пет минута током тридесетоминутне реперфузије (P2-P7). Међутим за статистичку анализу података узимане су у обзир три тачке од интереса: вредности у моменту стабилизације (C), након првог (P1) и последњег минута реперфузије (P7).

4.9.1. Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока изолованог срца нетретираних пацова

Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока нетретираних здравих и спонтано-хипертензивних животиња након двадесетоминутне исхемије која је праћена тридесетоминутном реперфузијом приказани су табеларно и графички (Табела 21, График 9).

У групи здравих пацова (CTRL) дошло је до значајног повећања $dp/dt \max$ у првој тачки реперфузије у односу на период стабилизације и последњи минут реперфузије. Значајан пад у $dp/dt \max$ као и апсолутној вредности $dp/dt \min$ забележен је у тачки P7 у односу на вредност пре исхемије. Додатно, након тридесетоминутне реперфузије вредност SLVP била је нижа у односу на тачку C, док се DLVP није значајно мењао унутар групе у посматраним тачкама од интереса. Изражено смањење срчане фреквенце као и вредности коронарног протока уочено је на крају реперфузионог периода у односу на вредности пре исхемије.

Код спонтано-хипертензивних нетретираних пацова уочен је статистички значајан скок у вредности $dp/dt \max$ у првом минуту реперфузије у односу на период стабилизације и крајњи минут реперфузије. Такође забележено је смањење вредности овог параметра на крају реперфузије у односу на стабилизацију. Дошло је до статистички значајног пада у апсолутној вредности $dp/dt \min$ на крају реперфузије у односу на први минут реперфузије и стабилизациони период. Додатно откривено је значајно смањење систолног притиска на крају реперфузије у односу на први минут повратка протока и период стабилизације. Такође ниже вредности срчане фреквенце и коронарног протока забележене су после тридесетоминутне реперфузије у односу на вредности пре исхемије.

Значајно ниже вредности $dp/dt \max$ у тренутку C и P1 и више апсолутне вредности $dp/dt \min$ у P1 уочене су код спонтано-хипертензивних у односу на здраве пацове. Систолни притисак у тренутку P1 и дијастолни у P1 и P7 били су нижи у SHR у односу на CTRL групу. Срчана фреквенца је бележила ниже вредности код SHR животиња у свим тачкама од интереса, док се коронарни проток није значајно разликовао.

Табела 21. Кардиодинамски параметри код нетретираних здравих и спонтано-хипертензивних пацова

| | | <i>dp/dt max(mmHg)</i> | <i>dp/dt min(mmHg)</i> | <i>SLVP(mmHg)</i> |
|-------------|-----------|------------------------|------------------------|-------------------|
| CTRL | C | 1603,8 ± 240,16 | -1101,85 ± 100,32 | 53,42 ± 8,77 |
| | P1 | 1815,8 ± 307,23* | -1045,23 ± 73,4 | 58,9 ± 7,65 |
| | P7 | 1300,7 ± 120,47*# | -904,07 ± 35,2* | 45,6 ± 7,22* |
| SHR | C | 1303,8 ± 235,2 | -1145,85 ± 90,32 | 49,6 ± 4,6 |
| | P1 | 1415,8 ± 123,5* | -1245,25 ± 73,26 | 53,6 ± 7,9 |
| | P7 | 1223,2 ± 118,54*# | -970,1 ± 84,4*# | 39,3 ± 6,2** |
| | | <i>DLVP(mmHg)</i> | <i>HR(bpm)</i> | <i>CF(ml/min)</i> |
| CTRL | C | 1,1 ± 0,19 | 275,4 ± 26,68 | 7,3 ± 0,52 |
| | P1 | 1,2 ± 0,13 | 305,07 ± 43,39 | 7,65 ± 0,31 |
| | P7 | 1,1 ± 0,17 | 217,1 ± 21,2* | 5,3 ± 0,66 |
| SHR | C | 1,01 ± 0,16 | 230,5 ± 25,2 | 7,5 ± 0,5 |
| | P1 | 1,1 ± 0,13 | 220,5 ± 31,2 | 7,2 ± 0,31 |
| | P7 | 0,93 ± 0,06 | 180,2 ± 19,2*# | 6,41 ± 0,66* |

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X±SD). C, стабилизација. P1, први минут реперфузије. P7, последњи минут реперфузије.

*Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку C у групи;

#Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку P1 у групи;

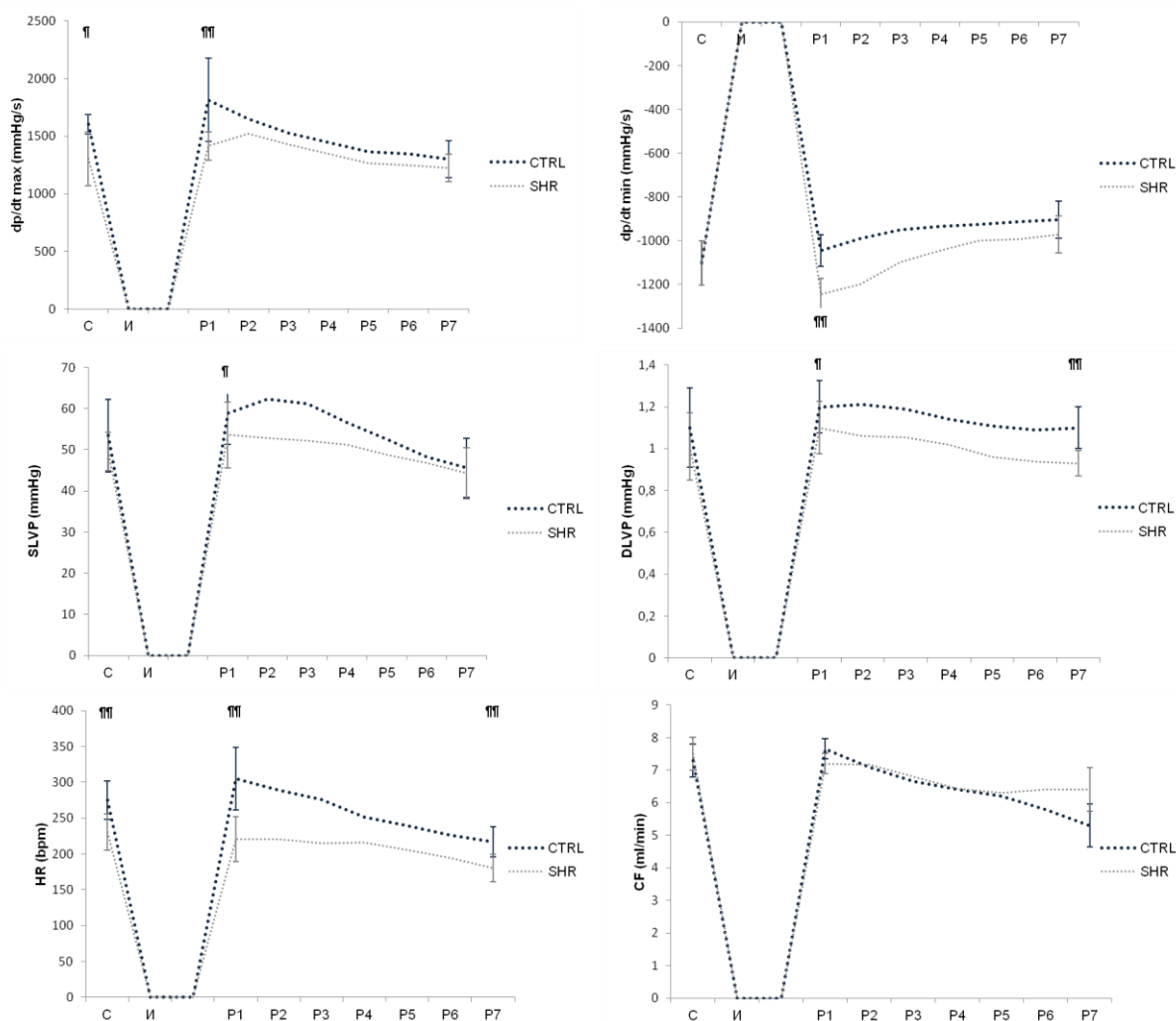


График 9. Кардиодинамски параметри и коронари проток нетретираних здравих (CTRL) и спонтано-хипертензивних (SHR) пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). C-стабилизација; И-исхемија; P1-P7 вредности на сваких 5 минута током 30 минута реперфузије. [†]статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у тренутку од интереса између група; ^{††}статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ у тренутку од интереса између група.

4.9.2. Ефекти екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток здравих пацова

4.9.2.1. Ефекти 500 mg/kg екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток здравих пацова

Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока приказани су табеларно и графички (Табела 22, График 10). Протоколом исхемије у трајању од 20 минута и реперфузије у трајању од 30 минута праћене су промене параметара функције срца у групи животиња које су претходно биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg (500 GVE). Такође приказане су статистички значајне разлике у наведеним параметрима под утицајем 500 mg/kg екстракта у односу на контролне услове (CTRL група).

У групи која је била третирана екстрактом ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg дошло је до скока у вредности $dp/dt \max$ у P1 у односу на тренутке C и P7, али у последњем моменту реперфузије вредности су биле сличне вредностима забележеним пре исхемије. Апсолутна вредност $dp/dt \min$ била је већа на крају реперфузије у односу на моменат стабилизације. Вредности систолног и дијастолног притиска у левој комори су остале константе током посматраног периода. Међутим када је реч о срчаној фреквенци забележено је повећање у P1 у односу на C, док није било значајних разлика у вредностима забележеним у P7 у односу на C.

Када се упореде здрави пацови и пацови на третману екстрактом, вредност $dp/dt \max$ је била значајно повишена у третираној групи у свим тачкама од интереса. Додатно апсолутне вредности $dp/dt \min$ биле су веће у групи која је користила екстракт у првом и последњем моменту реперфузије. Након употребе екстракта ивањског цвећа у највишој дози уочен је скок у вредностима систолног притиска пре исхемије и након завршетка реперфузије у односу на контролу, док није дошло до значајних промена на нивоу дијастолног притиска. Срчана фреквенца након тридесетоминутне реперфузије је била значајно виша у третираној групи, док је вредност коронарног протока у овој групи била већа у свим тачкама од интереса у односу на нетретиране пацове.

Табела 22. Ефекти третмана екстрактом ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца здравих пацова

| | | <i>dp/dt max(mmHg)</i> | <i>dp/dt min(mmHg)</i> | <i>SLVP(mmHg)</i> |
|----------------|-----------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| CTRL | C | 1603,8 ± 240,16 | -1101,85 ± 100,32 | 53,42 ± 8,77 |
| | P1 | 1815,8 ± 307,23* | -1045,23 ± 73,4 | 58,9 ± 7,65 |
| | P7 | 1300,7 ± 120,47* [#] | -904,07 ± 35,2* | 45,6 ± 7,22* |
| 500 GVE | C | 1700,2 ± 228,2 [¶] | -1168,82 ± 91,87 | 72,7 ± 4,62 [¶] |
| | P1 | 2037,65 ± 165,98* [¶] | -1323,93 ± 94,34 [¶] | 63,4 ± 4,95 |
| | P7 | 1690,2 ± 136,9 ^{#¶} | -1182,95 ± 69,04* [¶] | 62,4 ± 6,12* [¶] |
| | | <i>DLVP(mmHg)</i> | <i>HR(bpm)</i> | <i>CF(ml/min)</i> |
| CTRL | C | 1,1 ± 0,19 | 275,4 ± 26,68 | 7,3 ± 0,52 |
| | P1 | 1,2 ± 0,13 | 305,07 ± 43,39 | 7,65 ± 0,31 |
| | P7 | 1,1 ± 0,17 | 217,1 ± 21,2* | 5,3 ± 0,66 |
| 500 GVE | C | 1 ± 0,1 | 278,65 ± 33,46 | 8,95 ± 1,25 [¶] |
| | P1 | 1,2 ± 0,16 | 323,3 ± 29* | 9,8 ± 1,03 [¶] |
| | P7 | 1,01 ± 0,08 | 262,55 ± 21,3 [¶] | 8,2 ± 1,01 [¶] |

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X ± SD). C, стабилизација. P1, први минут реперфузије. P7, последњи минут реперфузије.*Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку C у групи; [#]Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку P1 у групи; [¶]Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на нетретираних животиње у истом тренутку од интереса.

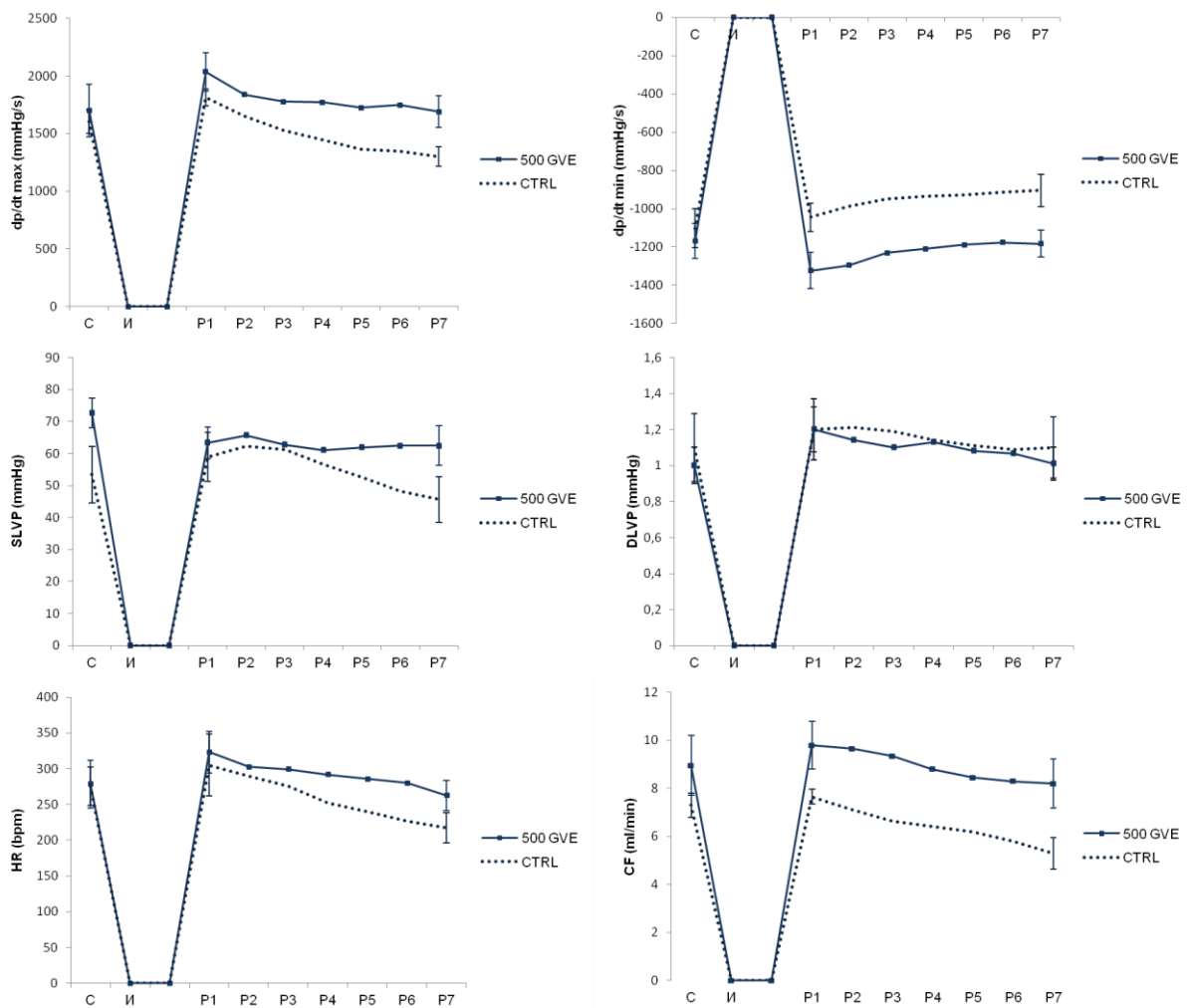


График 10. Кардиодинамски параметри и коронарни проток здравих пацова који су били на третману екстрактом од 500 mg/kg и нетретираних здравих пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). С-стабилизација; И-исхемија; P1-P7 вредности на сваких 5 минута током 30 минута реперфузије.

4.9.2.2. Ефекти 250 mg/kg екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток здравих пацова

Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока приказани су табеларно и графички (Табела 23, График 11). Протоколом исхемије у трајању од 20 минута и реперфузије у трајању од 30 минута праћене су промене параметара функције срца у групи животиња које су претходно биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg (250 GVE). Такође приказане су статистички значајне разлике у наведеним параметрима под утицајем 250 mg/kg екстракта у односу на контролне услове (CTRL група).

У групи која је била подвргнута третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 250 mg/kg уочен је пораст вредности $dp/dt \max$ у првом минуту реперфузије у односу на вредност пре исхемије. Након тридесетоминутне реперфузије вредности $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$ биле су сличне вредностима забележеним у периоду стабилизације. Такође вредности систолног, дијастолног притиска, као и срчане фреквенце и коронарног протока се нису значајно мењале током испитиваног периода.

Разлике између групе која је конзумирала екстракт ивањског цвећа у дози од 250 mg/kg и нетретираних пацова уочене су у вредностима свих испитиваних параметара изузев дијастолног притиска. Наиме на самом почетку реперфузије су откривене ниже вредности $dp/dt \max$, да би на крају реперфузије те вредности биле значајно више у односу на нетретираних пацова. Такође у овој групи дошло је до значајног повећања апсолутних вредности $dp/dt \min$ у свим посматраним тачкама од интереса. На крају тридесетоминутне реперфузије SLVP је бележио више вредности у групи која је користила екстракт ивањског цвећа. Додатно, у групи подвргнутој третману наведеним екстрактом запажене су ниже вредности срчане фреквенце у првом минуту реперфузије. Насупрот томе на самом крају реперфузије вредности овог параметра су биле значајно више у односу на нетретираних животиње. Такође конзумација екстракта ивањског цвећа довела је до повећања протока у првом и последњем минуту реперфузије у односу на групу која није била подвргнута наведеном третману.

Табела 23. Ефекти третмана екстрактом ивањског цвећа у дози од 250 mg/kg на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца здравих пацова

| | | <i>dp/dt max(mmHg)</i> | <i>dp/dt min(mmHg)</i> | <i>SLVP(mmHg)</i> |
|----------------|-----------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| CTRL | C | 1603,8 ± 240,16 | -1101,85 ± 100,32 | 53,42 ± 8,77 |
| | P1 | 1815,8 ± 307,23* | -1045,23 ± 73,4 | 58,9 ± 7,65 |
| | P7 | 1300,7 ± 120,47* [#] | -904,07 ± 35,2* | 45,6 ± 7,22* |
| 250 GVE | C | 1677,83 ± 86,76 | -1289,13 ± 146,16 [¶] | 53,72 ± 3,75 |
| | P1 | 1782,2 ± 361,83* [¶] | -1138 ± 130,33 [¶] | 59,5 ± 11,93 |
| | P7 | 1729,85 ± 160,18 [¶] | -1123 ± 228,2 [¶] | 56,8 ± 4,12 [¶] |
| | | <i>DLVP(mmHg)</i> | <i>HR(bpm)</i> | <i>CF(ml/min)</i> |
| CTRL | C | 1,1 ± 0,19 | 275,4 ± 26,68 | 7,3 ± 0,52 |
| | P1 | 1,2 ± 0,13 | 305,07 ± 43,39 | 7,65 ± 0,31 |
| | P7 | 1,1 ± 0,17 | 217,1 ± 21,2* | 5,3 ± 0,66 |
| 250 GVE | C | 1,2 ± 0,1 | 265,2 ± 23,2 | 7,6 ± 1,4 |
| | P1 | 1,12 ± 0,006 | 278,2 ± 32,3 [¶] | 8,4 ± 1,01 [¶] |
| | P7 | 1,03 ± 0,04 | 255,2 ± 36,3 [¶] | 7,62 ± 1,55 [¶] |

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X ± SD). C, стабилизација. P1, први минут реперфузије. P7, последњи минут реперфузије.*Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку C у групи; [#]Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку P1 у групи; [¶]Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на нетретираних животиње у истом тренутку од интереса.

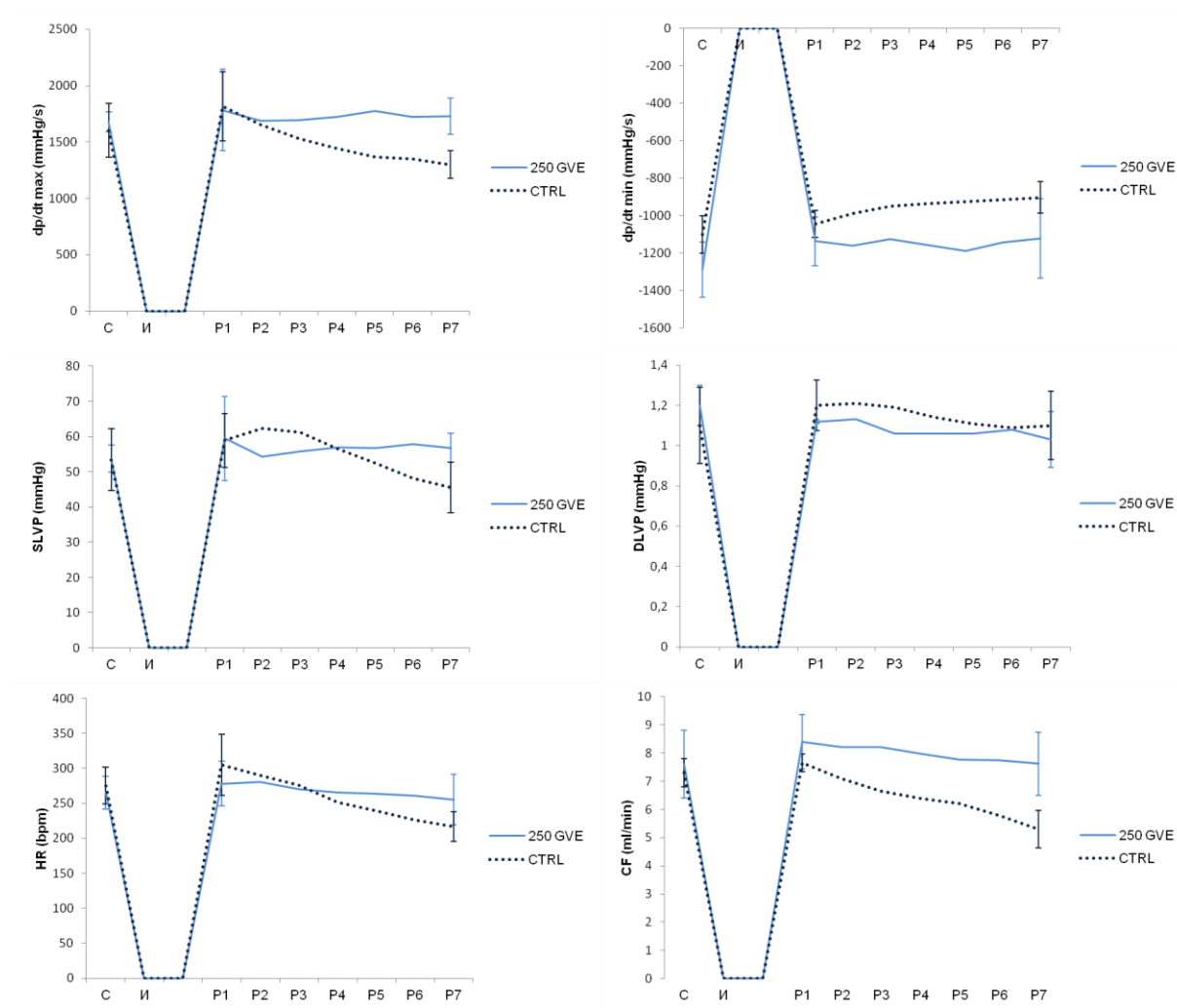


График 11. Кардиодинамски параметри и коронарни проток здравих пацова који су били на третману екстрактом од 250 mg/kg и нетретираних здравих пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). С-стабилизација; И-исхемија; P1-P7 вредности на сваких 5 минута током 30 минута реперфузије.

4.9.2.3. Ефекти 125 mg/kg екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток здравих пацова

Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока приказани су табеларно и графички (Табела 24, График 12). Протоколом исхемије у трајању од 20 минута и реперфузије у трајању од 30 минута праћене су промене параметара функције срца у групи животиња које су претходно биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg (125 GVE). Такође приказане су статистички значајне разлике у наведеним параметрима под утицајем 125 mg/kg екстракта у односу на контролне услове (CTRL група).

У групи изложеној четворонедељној примени екстракта ивањског цвећа у првом минуту реперфузије евидентиран је статистички значајан пораст у вредности $dp/dt \max$ у односу на контролу и последњи минут реперфузије. Додатно, на крају реперфузије уочава се значајан пад $dp/dt \max$ у односу на период стабилизације. Веће вредности коронарног протока забележене су у првом минуту реперфузије у односу на период пре исхемије и крај реперфузије. Међутим није било значајних промена у вредностима остаих испитиваних параметара, већ су оне биле константне током посматраног периода.

Статистички значајне разлике у вредностима $dp/dt \max$, $dp/dt \min$, HR и CF уочене су између нетретираних пацова и пацова који су били изложени третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 125 mg/kg. Наиме након тридесетоминутне реперфузије вредности $dp/dt \max$ у групи која је користила екстракт биле су значајно више. Веће апсолутне вредности $dp/dt \min$ у првом и последњем минуту реперфузије биле су уочене у третираној групи у односу на нетретиране. На почетку реперфузије повећање срчане фреквенце евидентирано је у нетретираној групи, да би на крају реперфузије виша вредност овог параметра била уочена у третираној групи. Такође по завршетку реперфузије откривене су веће вредности коронарног протока у групи изложеној екстракту.

Табела 24. Ефекти третмана екстрактом ивањског цвећа у дози од 125 mg/kg на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца здравих пацова

| | | <i>dp/dt max(mmHg)</i> | <i>dp/dt min(mmHg)</i> | <i>SLVP(mmHg)</i> |
|----------------|-----------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| CTRL | C | 1603,8 ± 240,16 | -1101,85 ± 100,32 | 53,42 ± 8,77 |
| | P1 | 1815,8 ± 307,23* | -1045,23 ± 73,4 | 58,9 ± 7,65 |
| | P7 | 1300,7 ± 120,47*# | -904,07 ± 35,2* | 45,6 ± 7,22* |
| 125 GVE | C | 1650,3 ± 402,14 | -1098,73 ± 352,19 | 49,28 ± 11,8 |
| | P1 | 1852,3 ± 495,6* | - 1123,5 ± 162,7 [¶] | 52,8 ± 5,5 |
| | P7 | 1506,17 ± 235,09*# [¶] | -1043,2 ± 329,7 [¶] | 47,2 ± 8,1 |
| | | <i>DLVP(mmHg)</i> | <i>HR(bpm)</i> | <i>CF(ml/min)</i> |
| CTRL | C | 1,1 ± 0,19 | 275,4 ± 26,68 | 7,3 ± 0,52 |
| | P1 | 1,2 ± 0,13 | 305,07 ± 43,39 | 7,65 ± 0,31 |
| | P7 | 1,1 ± 0,17 | 217,1 ± 21,2* | 5,3 ± 0,66 |
| 125 GVE | C | 1,1 ± 0,002 | 271,3 ± 32,8 | 7,2 ± 0,06 |
| | P1 | 1,15 ± 0,004 | 274,2 ± 45,5 [¶] | 8,2 ± 0,012* |
| | P7 | 0,96 ± 0,006 | 261,2 ± 31,2 [¶] | 7,1 ± 0,66 [¶] |

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X ± SD). C, стабилизација. P1, први минут реперфузије. P7, последњи минут реперфузије.*Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку C у групи; #Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку P1 у групи; [¶]Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на нетретирание животиње у истом тренутку од интереса.

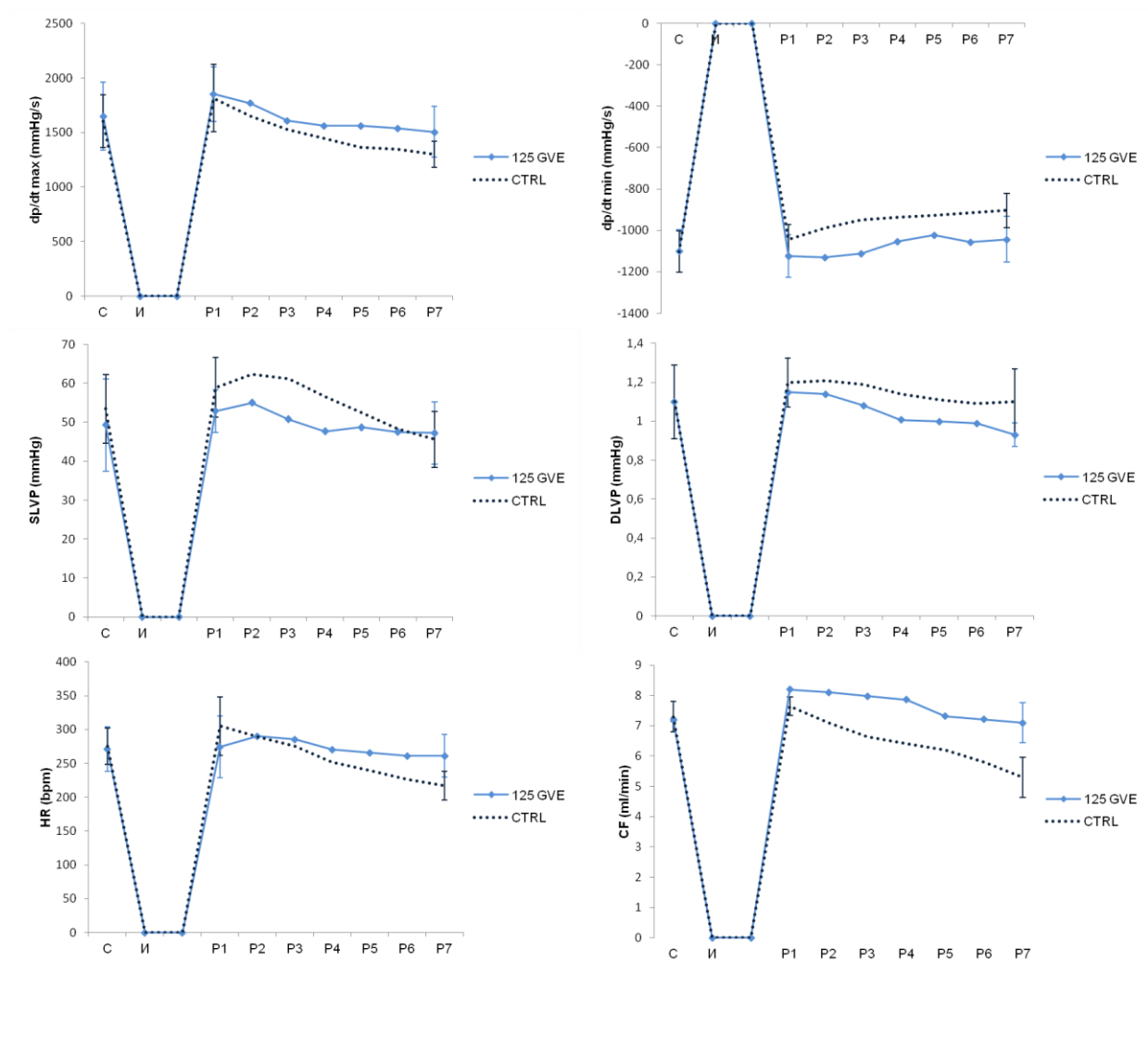


График 12. Кардиодинамски параметри и коронарни проток здравих пацова који су били на третману екстрактом од 125 mg/kg и нетретираних здравих пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). С-стабилизација; И-исхемија; P1-P7 вредности на сваких 5 минута током 30 минута реперфузије.

4.9.2.4. Промене кардиодинамских параметара и коронарног протока изолованог срца здравих пацова у односу на примењену дозу екстракта ивањског цвећа

Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока приказани су на графику 13. Протоколом исхемије у трајању од 20 минута и реперфузије у трајању од 30 минута праћене су промене параметара функције срца у групи здравих животиња у односу на примењену дозу екстракт ивањског цвећа.

У тренутку стабилизације није било разлика у вредности dp/dt max између група, међутим апсолутна вредност dp/dt min је била значајно нижа у групи која је користила најмању дозу у односу на остале групе. С друге стране статистички значајан пораст апсолутних вредности ових параметара уочен је у првом минуту реперфузије у групи која је подвргнута највећој дози екстракта у односу на друге две примењене дозе. Након тридесетоминутне реперфузије вредност dp/dt max и dp/dt min се нису разликовале између група на третману екстрактом у дози од 500 mg/kg и 250 mg/kg, али су те вредности значајно више у односу на вредности ова два параметра код пацова који су користили 125 mg/kg екстракта. У периоду стабилизације вредност систолног притиска у левој комори била је значајно виша у групи која је конзумирала 500 mg/kg екстракта у односу на друге две групе. У првом и последњем минуту реперфузије уочава се статистички значајан скок у вредности систолног притиска у групи која је примала највишу дозу екстракта у односу на најнижу. Исти тренд је присутан на крају тридесетоминутне реперфузије када је реч о дијастолном притиску. На почетку реперфузије вредност срчане фреквенце је била статистички значајно виша у групи која је била изложена дози од 500 mg/kg у односу на остале две дозе, док су на крају реперфузионог периода сличне вредности овог параметра забележене у све три групе. Коронарни проток је био највиши у групи која је била на третману највећом дозом у односу на остале две дозе у свим испитиваним тренуцима.

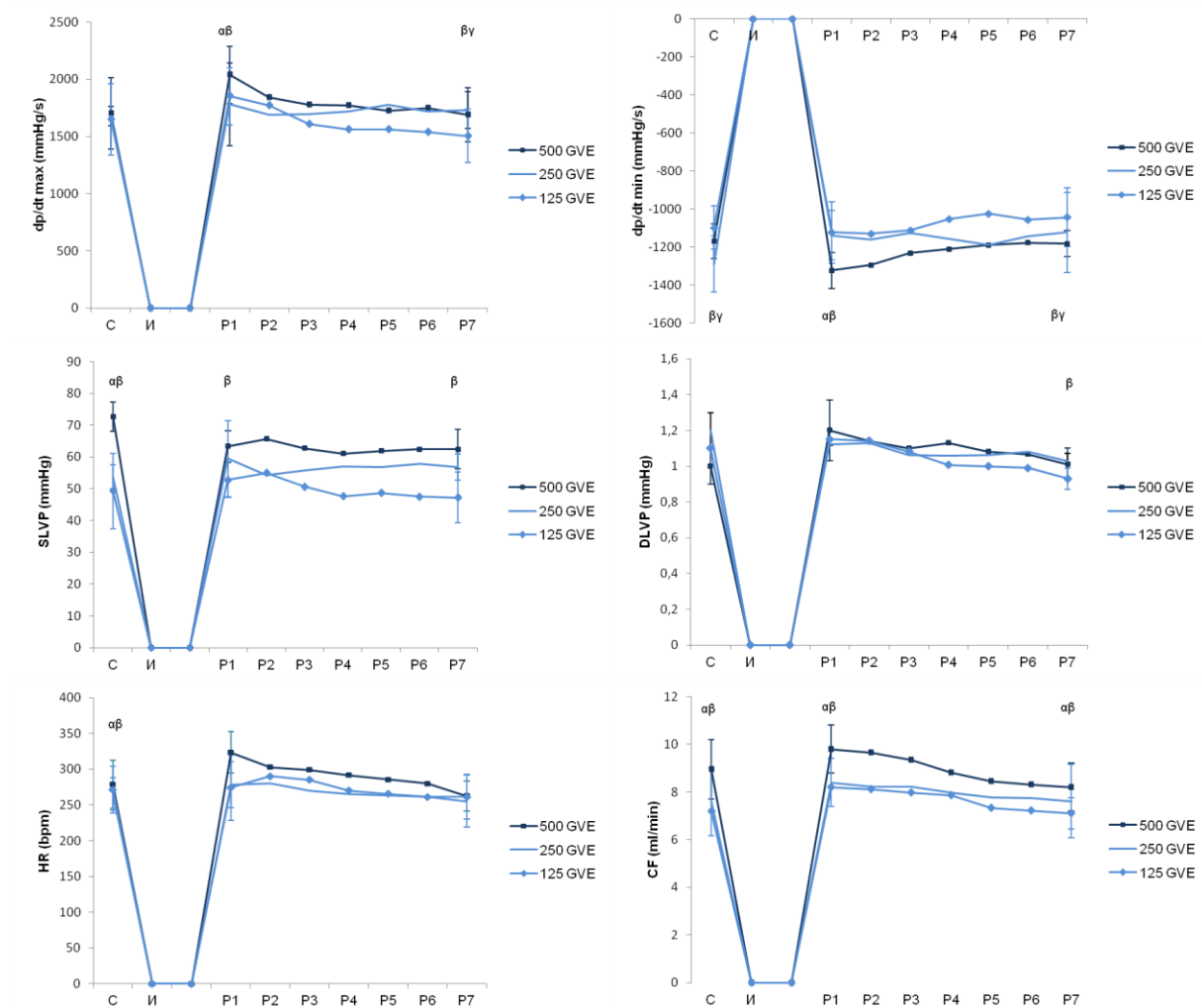


График 13. Поређење ефеката различитих доза екстракта ивањског цвећа кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца здравих пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). С-стабилизација; И-исхемија; P1-P7 вредности на сваких 5 минута током 30 минута реперфузије. α Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе 500 GVE и 250 GVE у тренутку од интереса; β Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе 500 GVE и 125 GVE; γ Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе 250 GVE и 125 GVE;

4.9.3. Ефекти екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток спонтано-хипертензивних пацова

4.9.3.1. Ефекти 500 mg/kg екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток спонтано-хипертензивних пацова

Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока приказани су табеларно и графички (Табела 25, График 14) Протоколом исхемије у трајању од 20 минута и реперфузије у трајању од 30 минута праћене су промене параметара функције срца у групи хипертензивних животиња које су претходно биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg (SHR + 500 GVE). Такође приказане су статистички значајне разлике у наведеним параметрима под утицајем 500 mg/kg екстракта у односу на контролне услове (SHR група).

У групи изложеној третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg вредности испитиваних параметара функције срца нису се значајно мењале током посматраног периода. Више вредности $dp/dt \max$ у тачкама C и P7 биле су уочене у третираној групи у односу на спонтано-хипертензивну контролу. Додатно у групи која је конзумирала екстракт ивањског цвећа у последњем минути реперфузије биле су присутне изражено више апсолутне вредности $dp/dt \min$. Такође претретман ивањским цвећем резултирао је значајним повећањем систолног притиска на крају реперфузије у односу на нетретиране пацове. Срчана фреквенца је била значајно виша у периоду стабилизације и по завршетку реперфузије у групи која је била изложена третману екстрактом. Такође код ових пацова коронарни проток је био значајно виши у свим испитиваним тренуцима.

Табела 25. Ефекти третмана екстрактом ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца спонтано-хипертензивних пацова

| | | <i>dp/dt max(mmHg)</i> | <i>dp/dt min(mmHg)</i> | <i>SLVP(mmHg)</i> |
|----------------------|-----------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| SHR | C | 1303,8 ± 235,2 | -1145,85 ± 90,32 | 49,6 ± 4,6 |
| | P1 | 1415,8 ± 123,5* | -1245,25 ± 73,26 | 53,6 ± 7,9 |
| | P7 | 1223,2 ± 118,54*# | -970,1 ± 84,4*# | 39,3 ± 6,2** |
| SHR + 500 GVE | C | 1450 ± 75,9 [¶] | -1188,83 ± 90,8 | 53,42 ± 8,77 |
| | P1 | 1435,1 ± 146,8 | -1212,93 ± 40,2 | 58,1 ± 7,66 |
| | P7 | 1420,8 ± 59,5 [¶] | -1121,95 ± 150,2 [¶] | 42,1 ± 7,2 [¶] |
| | | <i>DLVP(mmHg)</i> | <i>HR(bpm)</i> | <i>CF(ml/min)</i> |
| SHR | C | 1,01 ± 0,16 | 230,5 ± 25,2 | 7,5 ± 0,5 |
| | P1 | 1,1 ± 0,13 | 220,5 ± 31,2 | 7,2 ± 0,31 |
| | P7 | 0,93 ± 0,06 | 180,2 ± 19,2*# | 6,41 ± 0,66* |
| SHR + 500 GVE | C | 1,3 ± 0,1 | 250,3 ± 20,2 [¶] | 8,6 ± 1,2 [¶] |
| | P1 | 1,28 ± 0,01 | 248,9 ± 28,5 | 9,2 ± 0,97 [¶] |
| | P7 | 1,29 ± 0,14 | 230,8 ± 19,8 [¶] | 8,1 ± 1,12 [¶] |

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). C, стабилизација. P1, први минут реперфузије. P7, последњи минут реперфузије.*Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку C у групи; #Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку P1 у групи; [¶]Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на нетретираних животиње у истом тренутку од интереса.

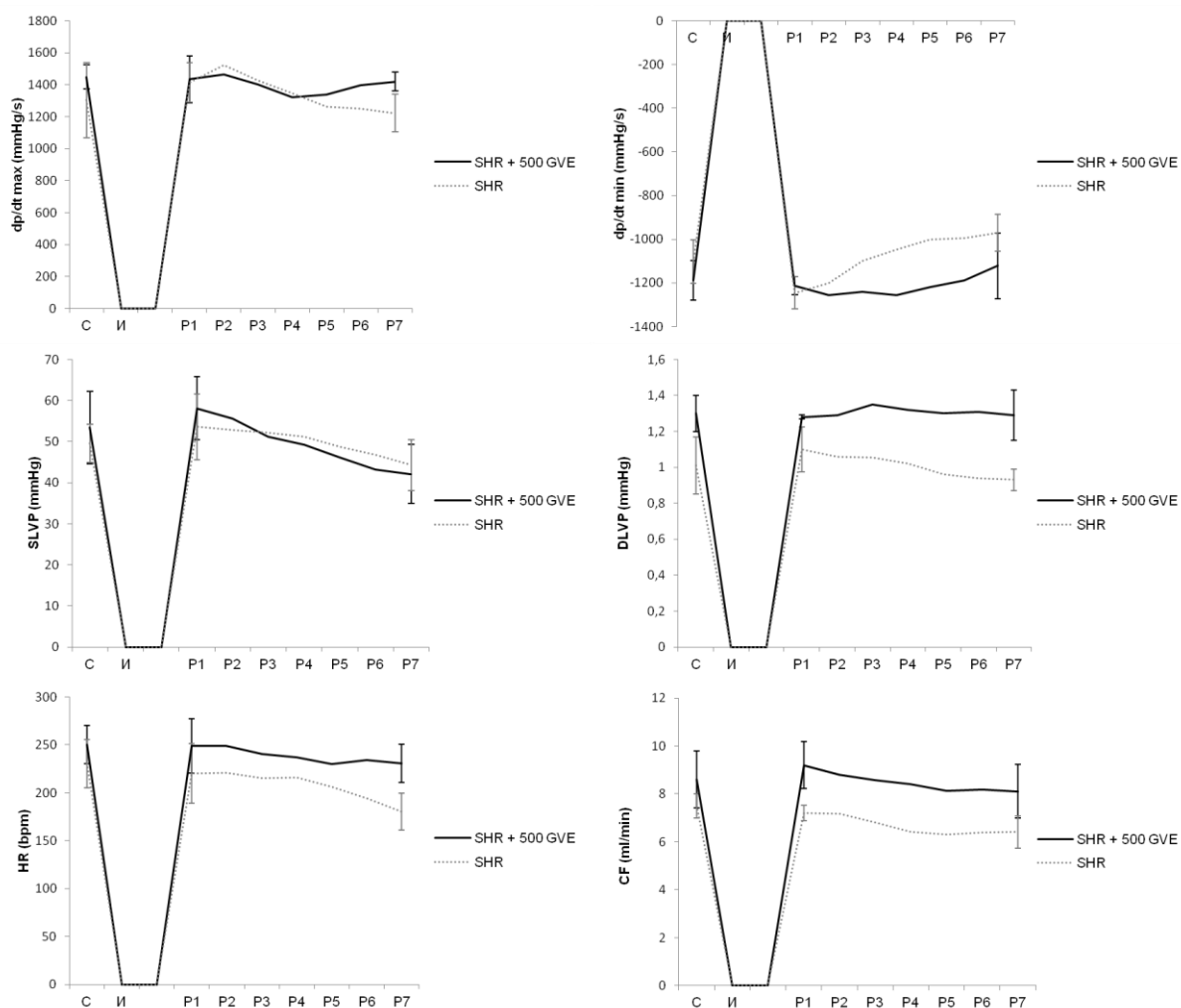


График 14. Кардиодинамски параметри и коронарни проток спонтано-хипертензивних пацова који су били на третману екстрактом од 500 mg/kg и нетретираних хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). C-стабилизација; И-исхемија; P1-P7 вредности на сваких 5 минута током 30 минута реперфузије.

4.9.3.2. Ефекти 250 mg/kg екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток спонтано-хипертензивних пацова

Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока приказани су и табеларно и графички (Табела 26, График 15). Протоколом исхемије у трајању од 20 минута и реперфузије у трајању од 30 минута праћене су промене параметара функције срца у групи хипертензивних животиња које су претходно биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 250 mg/kg (SHR + 250 GVE). Такође приказане су статистички значајне разлике у наведеним параметрима под утицајем 250 mg/kg екстракта у односу на контролне услове (SHR група).

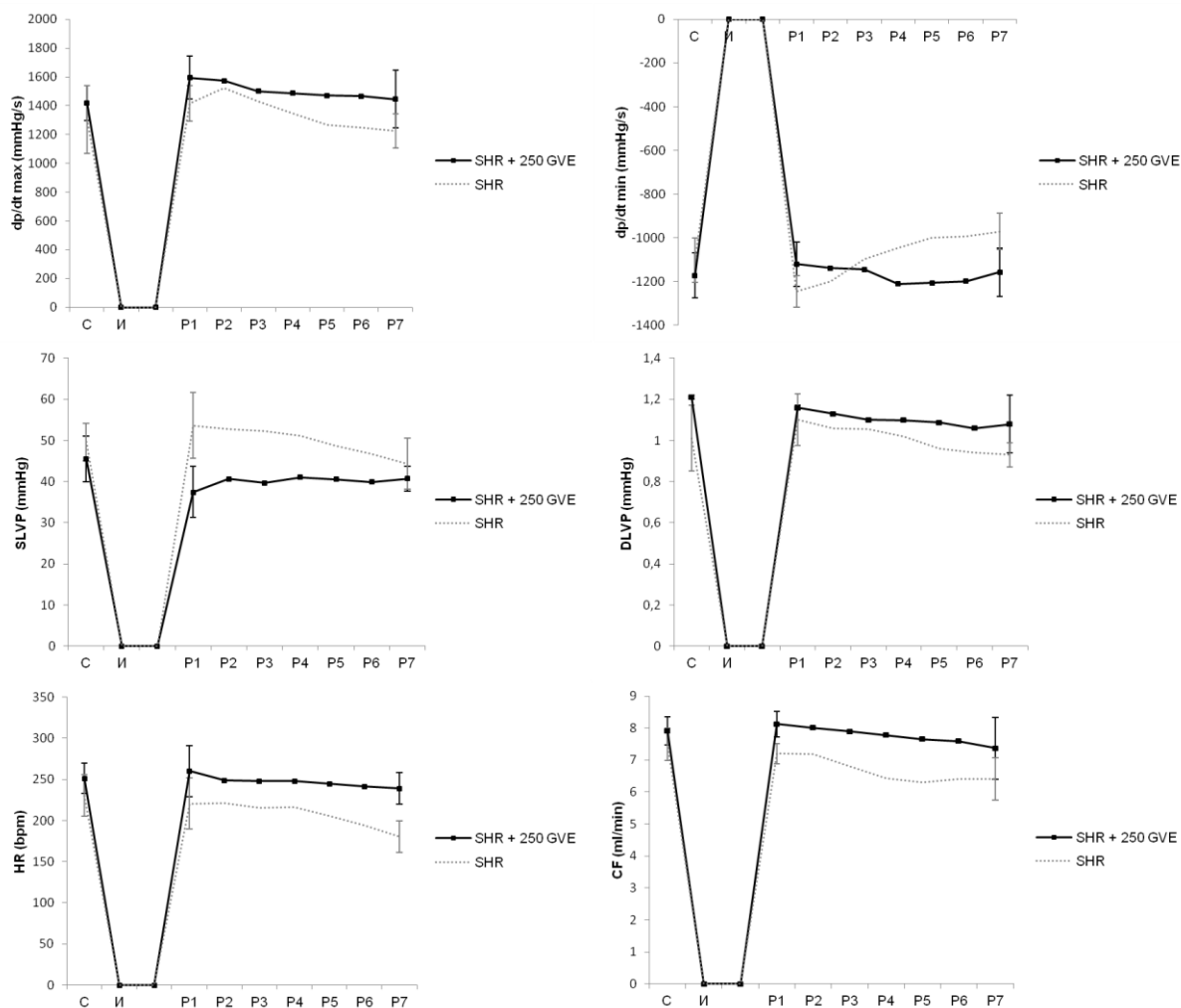
Статистички значајно повећање вредности $dp/dt \max$ и смањење $dp/dt \min$ уочено је у групи изложеној третману ивањским цвећем у првом минуту реперфузије у односу на период стабилизације и крај реперфузије. Такође забележен је скок срчане фреквенце у прво минуту у односу на последњи минут реперфузије.

Када се упореде вредности кардиодинамских параметара у групи нетретираних и третираних пацова уочавају се следеће промене: у третираној групи дошло је до повећања вредности $dp/dt \max$ у свим тачкама од интереса, $dp/dt \min$ у крајњем минуту реперфузије, систолног притиска у првом минуту реперфузије и срчане фреквенце у првом и последњем минуту реперфузије. Такође вредности коронарног протока су биле више у групи која је конзумирала екстракт ивањског цвећа на почетку и крају реперфузије.

Табела 26. Ефекти третмана екстрактом ивањског цвећа у дози од 250 mg/kg на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца спонтано-хипертензивних пацова

| | | <i>dp/dt max(mmHg)</i> | <i>dp/dt min(mmHg)</i> | <i>SLVP(mmHg)</i> |
|----------------------|-----------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------|
| SHR | <i>C</i> | 1303,8 ± 235,2 | -1145,85 ± 90,32 | 49,6 ± 4,6 |
| | <i>P1</i> | 1415,8 ± 123,5* | -1245,25 ± 73,26 | 53,6 ± 7,9 |
| | <i>P7</i> | 1223,2 ± 118,54*# | -970,1 ± 84,4*# | 39,3 ± 6,2** |
| SHR + 250 GVE | <i>C</i> | 1418,15 ± 121,3 [¶] | -1172 ± 102,3 | 45,5 ± 5,5 |
| | <i>P1</i> | 1595,13 ± 150,6* [¶] | -1120,2 ± 102,3* | 37,4 ± 6,2 [¶] |
| | <i>P7</i> | 1444,17 ± 200,5 [¶] | -1156,8 ± 110,2 [¶] | 40,7 ± 3,1 |
| | | <i>DLVP(mmHg)</i> | <i>HR(bpm)</i> | <i>CF(ml/min)</i> |
| SHR | <i>C</i> | 1,01 ± 0,16 | 230,5 ± 25,2 | 7,5 ± 0,5 |
| | <i>P1</i> | 1,1 ± 0,13 | 220,5 ± 31,2 | 7,2 ± 0,31 |
| | <i>P7</i> | 0,93 ± 0,06 | 180,2 ± 19,2*# | 6,41 ± 0,66* |
| SHR + 250 GVE | <i>C</i> | 1,21 ± 0,009 | 251,2 ± 18,2 | 7,91 ± 0,45 |
| | <i>P1</i> | 1,16 ± 0,01 | 260,2 ± 31,1 [¶] | 8,12 ± 0,39 [¶] |
| | <i>P7</i> | 1,08 ± 0,14 | 239,2 ± 19,2 [¶] | 7,39 ± 0,96 [¶] |

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X ± SD). C, стабилизација. P1, први минут реперфузије. P7, последњи минут реперфузије.*Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку C у групи; #Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку P1 у групи; [¶]Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на нетретираних животиње у истом тренутку од интереса.



Графикон 15. Кардиодинамски параметри и коронарни проток спонтано-хипертензивних пацова који су били на третману екстрактом од 250 mg/kg и нетретираних хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). С-стабилизација; И-исхемија; P1-P7 вредности на сваких 5 минута током 30 минута реперфузије.

4.9.3.3. Ефекти 125 mg/kg екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток спонтано-хипертензивних пацова

Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока приказани су табеларно и графилки (Табела 27, График 16). Протоколом исхемије у трајању од 20 минута и реперфузије у трајању од 30 минута праћене су промене параметара функције срца у групи хипертензивних животиња које су претходно биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 125 mg/kg (SHR + 125 GVE). Такође приказане су статистички значајне разлике у наведеним параметрима под утицајем 125 mg/kg екстракта у односу на контролне услове (SHR група).

Откривено је статистички значајно повећање вредности dp/dt max у групи изложеној третману ивањским цвећем у првом минуту реперфузије у односу на период стабилизације и крај реперфузије. Остали испитивани параметри у наведеној групи су бележили сличне вредности у испитиваним тачкама од интереса. Екстракт ивањског цвећа довео до повећања вредности dp/dt min у првом и последњем моменту реперфузије и DLVP на крају реперфузије у односу на нетретиране животиње. Такође забележене су више вредности срчане фреквенце у првом и последњем минуту реперфузије и коронарног протока у првом минуту реперфузије у третираној групи пацова.

Табела 27. Ефекти третмана екстрактом ивањског цвећа у дози од 125 mg/kg на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца спонтано-хипертензивних пацова

| | | <i>dp/dt max(mmHg)</i> | <i>dp/dt min(mmHg)</i> | <i>SLVP(mmHg)</i> |
|----------------------|-----------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------|
| SHR | C | 1303,8 ± 235,2 | -1145,85 ± 90,32 | 49,6 ± 4,6 |
| | P1 | 1415,8 ± 123,5* | -1245,25 ± 73,26 | 53,6 ± 7,9 |
| | P7 | 1223,2 ± 118,54* [#] | -970,1 ± 84,4* [#] | 39,3 ± 6,2 ^{#*} |
| SHR + 125 GVE | C | 1315,2 ± 54,95 | -1056,2 ± 56,3 | 45,6 ± 4,51 |
| | P1 | 1446,3 ± 235,2* | -1098,9 ± 84,5 [¶] | 45,56 ± 5,54 |
| | P7 | 1310,2 ± 220 [#] | -1016,2 ± 140,2 [¶] | 41,3 ± 13,5 |
| | | <i>DLVP(mmHg)</i> | <i>HR(bpm)</i> | <i>CF(ml/min)</i> |
| SHR | C | 1,01 ± 0,16 | 230,5 ± 25,2 | 7,5 ± 0,5 |
| | P1 | 1,1 ± 0,13 | 220,5 ± 31,2 | 7,2 ± 0,31 |
| | P7 | 0,93 ± 0,06 | 180,2 ± 19,2* [#] | 6,41 ± 0,66* |
| SHR + 125 GVE | C | 1,15 ± 0,3 | 245,2 ± 17,3 | 7,56 ± 0,23 |
| | P1 | 1,12 ± 0,13 | 256,2 ± 21,9 [¶] | 8,17 ± 0,15 [¶] |
| | P7 | 1,12 ± 0,06 [¶] | 234,2 ± 12,3 [¶] | 6,97 ± 0,159 |

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X ± SD). C, стабилизација. P1, први минут реперфузије. P7, последњи минут реперфузије.*Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку C у групи; [#]Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку P1 у групи; [¶]Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на нетретираних животиње у истом тренутку од интереса.

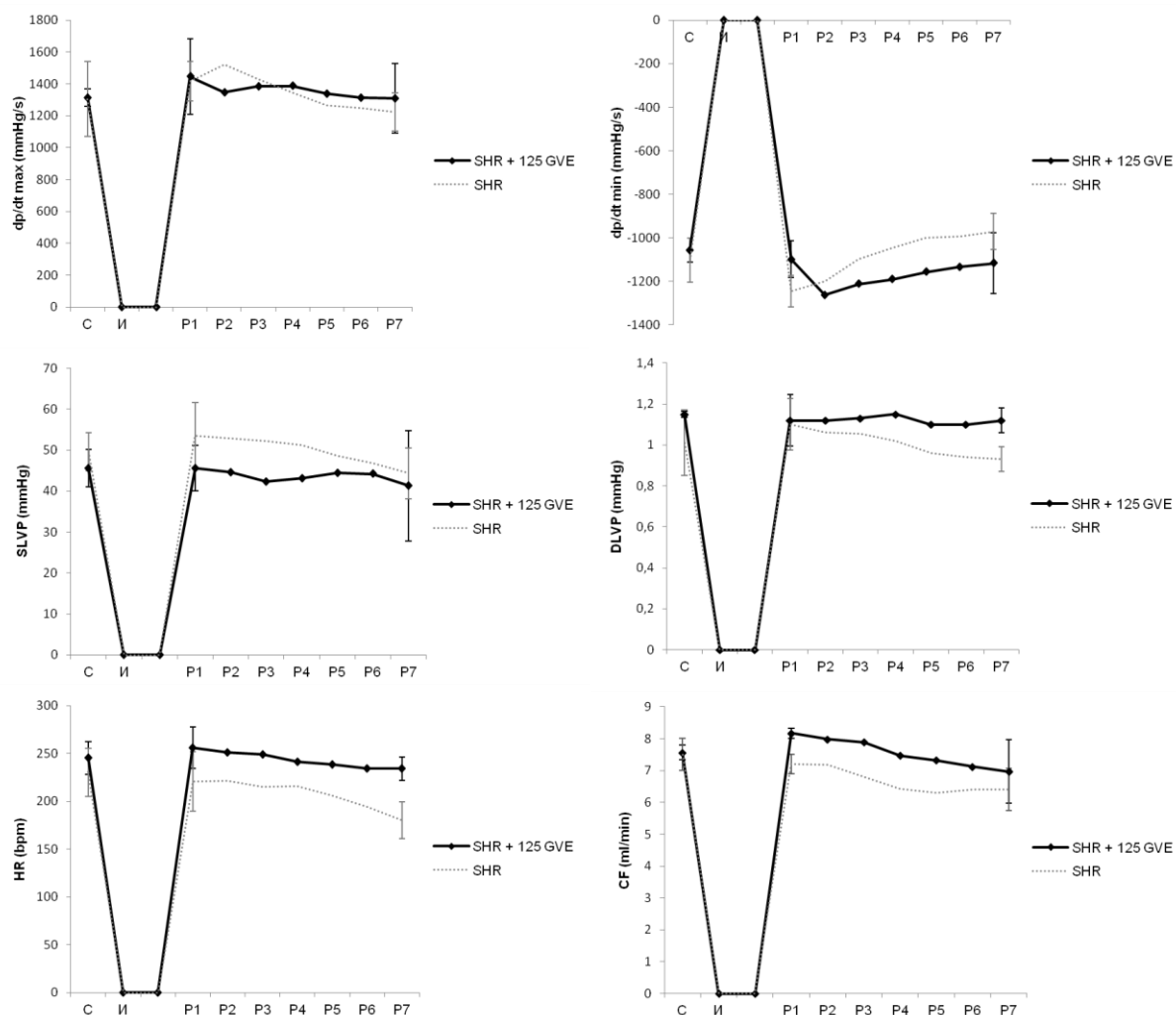


График 16. Кардиодинамски параметри и коронарни проток спонтано-хипертензивних пацова који су били на третману екстрактом од 125 mg/kg и нетретираних хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). C-стабилизација; И-исхемија; P1-P7 вредности на сваких 5 минута током 30 минута реперфузије.

4.9.3.4. Промене кардиодинамских параметара и коронарног протока изолованог срца спонтано-хипертензивних пацова у односу на примењену дозу екстракта ивањског цвећа

Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока приказани су на графику 17. Протоколом исхемије у трајању од 20 минута и реперфузије у трајању од 30 минута праћене су промене параметара функције срца у групи спонтано-хипертензивних животиња у односу на примењену дозу екстракта ивањског цвећа.

Апсолутне вредности $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$ су биле значајно више у групама третираним са 500 и 250 екстракта у односу на групу 125 у периоду стабилизације и на крају реперфузије. Додатно у првом минуту реперфузије запажена је значајно виша вредност $dp/dt \max$ у 250 у односу на остале групе, док када је реч о $dp/dt \min$ више вредности су биле присутне у групи изложеној највећој дози у односу на остале примењене дозе. Повећање вредности систолног притиска уочено је у групи која је била на третману 500 екстракта у односу на 250 и 125 у периоду стабилизације и првом минуту реперфузије. Исти тренд је уочен код дијастолног притиска, али на крају реперфузије. Промена дозе примењеног екстракта није имала утицаја на вредност срчане фреквенце, док је коронарни проток био значајно виши у групи третираној са 500 екстракта у односу на 125 екстракта у свим испитиваним тренуцима.

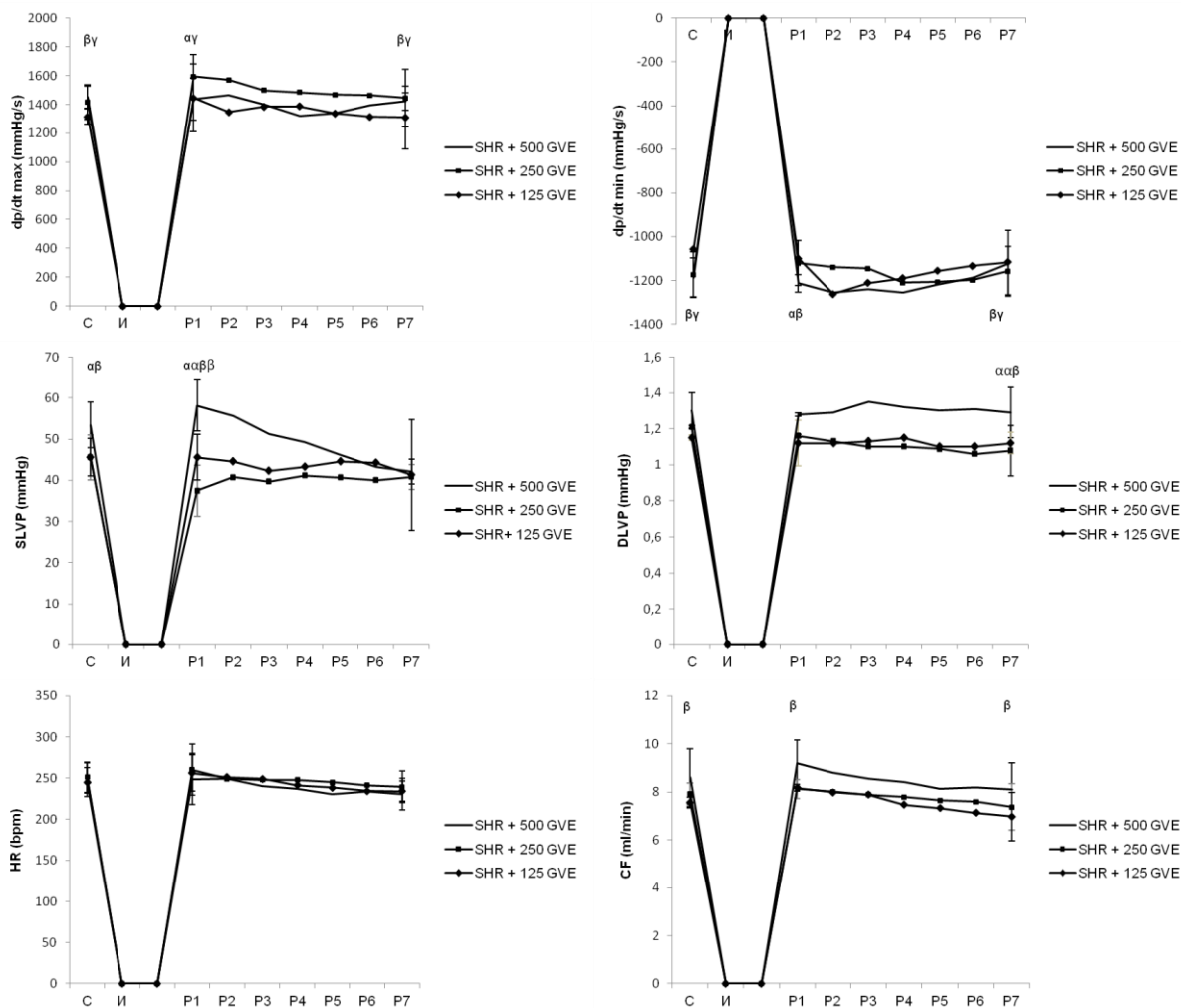


График 17. Поређење ефеката различитих доза екстракта ивањског цвећа кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца спонтано-хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). C-стабилизација; И-исхемија; P1-P7 вредности на сваких 5 минута током 30 минута реперфузије. α Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе SHR + 500 GVE и SHR + 250 GVE у тренутку од интереса; $\alpha\alpha$ Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ између групе SHR + 500 GVE и SHR + 250 GVE у тренутку од интереса; β Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе SHR + 500 GVE и SHR + 125 GVE; $\beta\beta$ Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ између групе SHR + 500 GVE и SHR + 125 GVE; γ Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе SHR + 250 GVE и SHR + 125 GVE;

4.9.4. Разлике у ефектима екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток код здравих и спонтано-хипертензивних пацова

Промене параметара функције срца у групи нормотензивних и спонтано-хипертензивних животиња под утицајем различитих доза екстракта приказане су графички (Графику 18, 19 и 20).

Виша вредност $dp/dt \max$ била је уочена код здравих животиња на третману екстрактом у дози од 500 mg/kg током целог посматраног периода у односу на хипертензивне животиње, док није било разлика у вредности $dp/dt \min$. Такође вредности систолног притиска су биле више, а дијастолног ниже у групи здравих у периоду стабилизације и на крају реперфузије. Примена екстракта код здравих била је повезана са статистички значајним повећањем срчане фреквенце у свим тренуцима, док се коронарни проток није значајно разликовао између испитиваних група (График 18).

У групи здравих пацова на третману екстрактом у дози од 250 mg/kg забележене су више вредности $dp/dt \max$ и SLVP током свих испитиваних тачака од интереса, $dp/dt \min$ у периоду стабилизације и HR у првом минути реперфузије. Дијастолни притисак ни коронарни проток се нису значајно разликовали између нормотензивних и хипертензивних пацова током посматраног периода (График 19).

Вредност $dp/dt \max$ и HR у групи здравих пацова који су користили 125 mg/kg екстракта била је значајно виша у односу на хипертензивне пацове током испитиваног периода, док се вредност $dp/dt \min$ и коронарног протока није значајно разликовала. Код хипертензивних пацова систолни притисак је био нижи на почетку реперфузије, а дијастолни виши на крају реперфузије у односу на здраве (График 20).

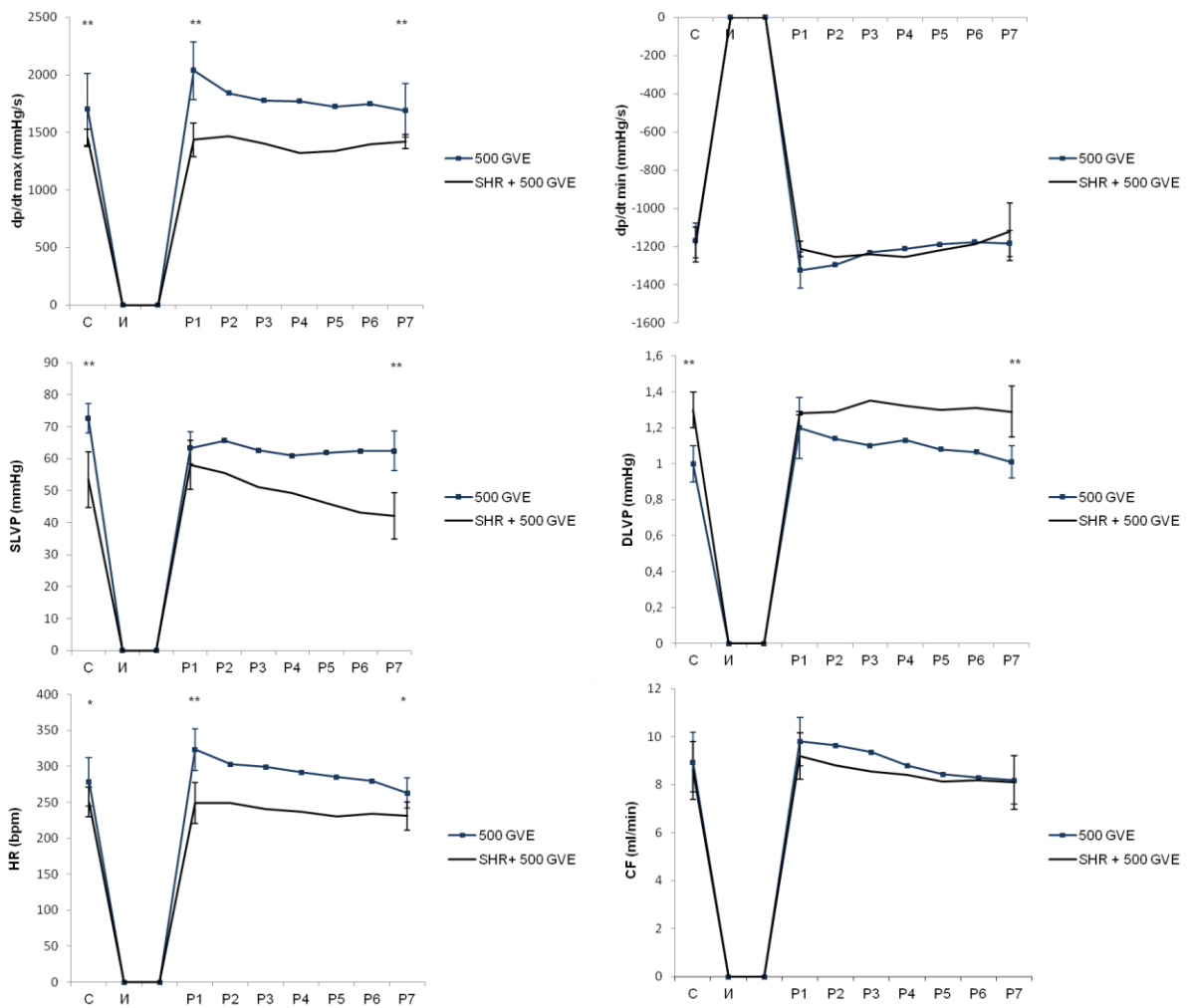


График 18. Поређење ефеката 500 mg/kg екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре нормотензивних и спонтано-хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). С-стабилизација; И-исхемија; P1-P7 вредности на сваких 5 минута током 30 минута реперфузије. *Статистички значајна разлика између група 500 GVE и SHR + 500 GVE; **Статистички високо значајна разлика између група 500 GVE и SHR + 500 GVE;

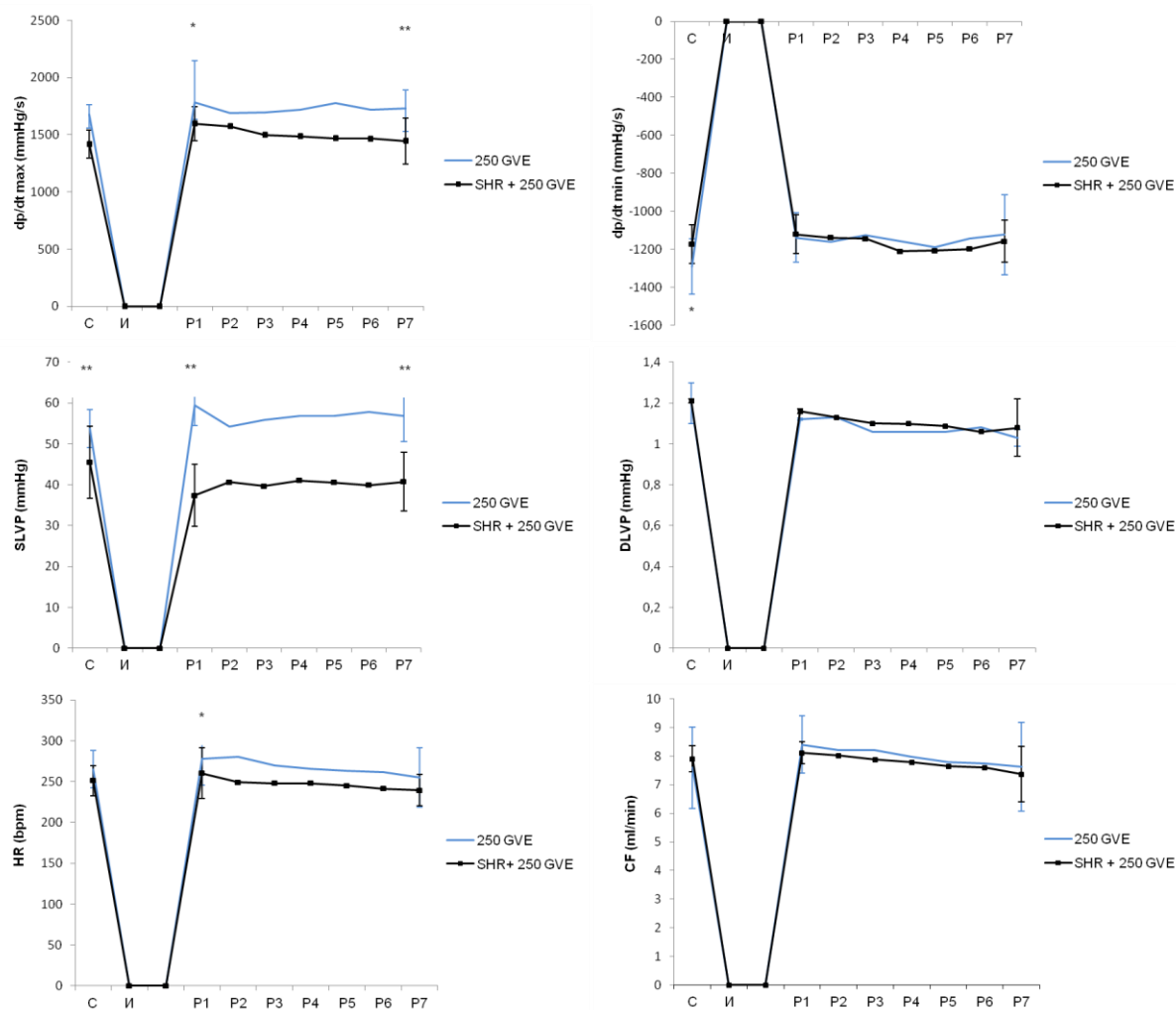


График 19. Поређење ефеката 250 mg/kg екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре нормотензивних и спонтано-хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). С-стабилизација; И-исхемија; P1-P7 вредности на сваких 5 минута током 30 минута реперфузије. *Статистички значајна разлика између група 250 GVE и SHR + 250 GVE; **Статистички високо значајна разлика између група 250 GVE и SHR + 250 GVE;

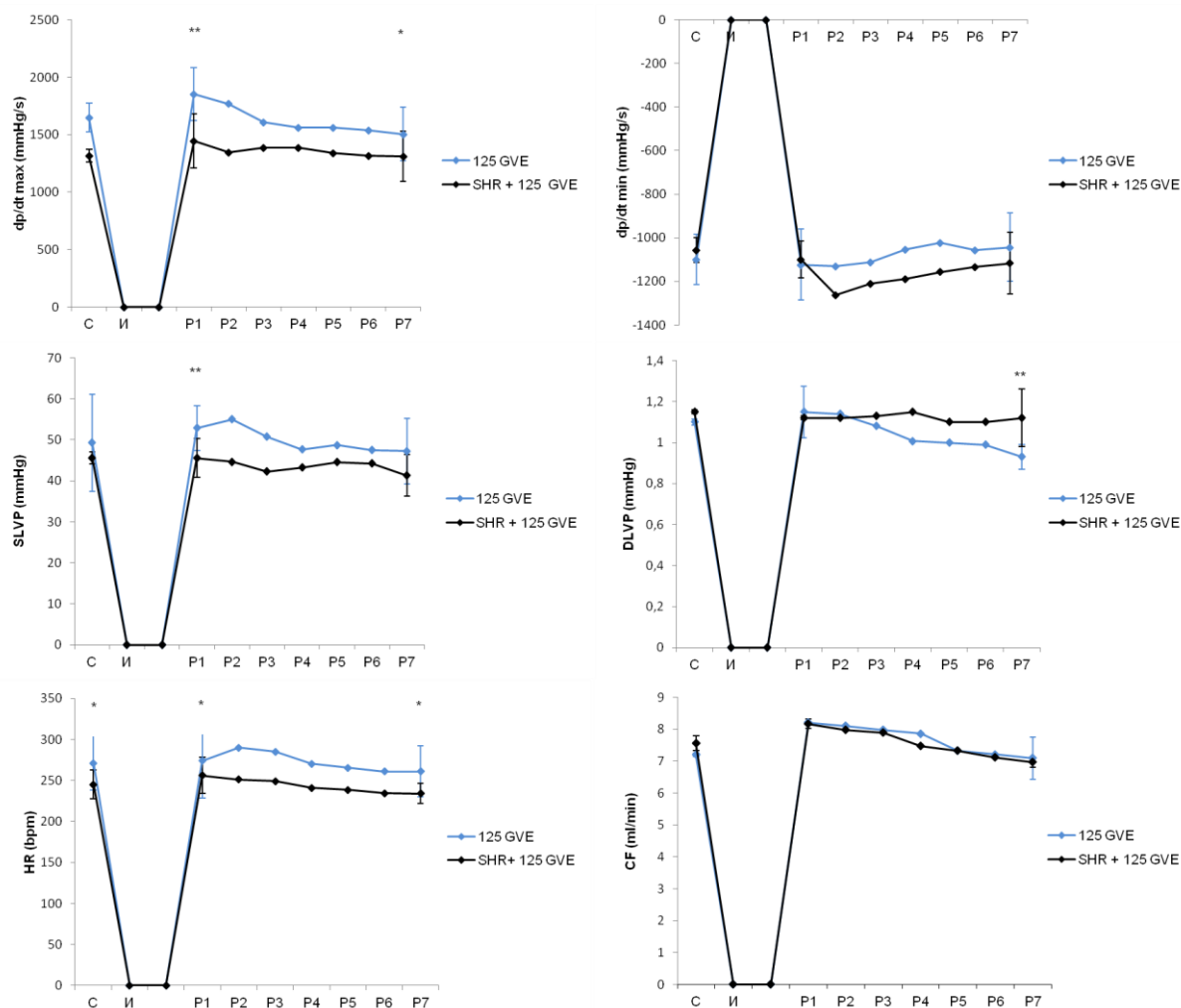


График 20. Поређење ефеката 125 mg/kg екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре нормотензивних и спонтано-хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). С-стабилизација; И-исхемија; P1-P7 вредности на сваких 5 минута током 30 минута реперфузије. *Статистички значајна разлика између група 125 GVE и SHR + 125 GVE; **Статистички високо значајна разлика између група 125 GVE и SHR + 125 GVE;

4.10. Ефекти екстраката ивањског цвећа на маркере оксидационог стреса у перфузату изолованог срца пацова

Концентрације про-оксиданаса као што су O_2^- , NO_2^- , H_2O_2 и TBARS одређиване су из коронарног венског ефлуента који је сакупљан у тренутку стабилизације (С), првом минути реперфузије након исхемије (P1) и на сваких пет минута током тридесетоминутне реперфузије (P2-P7). Међутим за статистичку анализу података узимане су у обзир три тачке од интереса: вредности у моменту стабилизације (С), након првог (P1) и последњег минута реперфузије (P7).

4.10.1. Вредности маркера оксидационог стреса у перфузату изолованог срца нетретираних пацова

Протоколом исхемије у трајању од 20 минута и реперфузије у трајању од 30 минута праћене су промене маркера оксидационог оштећења у групи здравих и хипертензивних животиња, а вредности испитиваних параметара су приказане су табеларно и графички (Табела 28, График 21).

И-Р је довела до значајног скока у концентрацији свих испитиваних макера оксидационог стреса на крају реперфузије у односу на вредности пре исхемије како у условима нормотензије тако и код хипертензивних пацова. Ниво TBARS-а је био значајно повишен у првом минути реперфузије у обе групе у односу на стабилизациони период, док је ниво NO_2^- био повишен на почетку реперфузије у односу на стабилизацију само код хипертензивних пацова.

Код хипертензивних пацова уочена је виша концентрација O_2^- и TBARS на крају реперфузије, H_2O_2 у првом и последњем минути реперфузије, као и нижа концентрација NO_2^- у стабилизацији.

Табела 28. Прооксидациони маркери у коронарном венском ефлуенту нетретираних здравих и спонтано-хипертензивних пацова

| | | TBARS ($\mu\text{mol/ml}$) | NO_2^- (nmol/ml) | O_2^- (nmol/ml) | H_2O_2 (nmol/ml) |
|-------------|-----------|------------------------------|------------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| CTRL | C | 22,3 \pm 2,4 | 97,7 \pm 14,9 | 58,3 \pm 1,3 | 56,5 \pm 4,2 |
| | P1 | 27,4 \pm 1,8* | 104,5 \pm 13,9 | 62 \pm 1 | 59,2 \pm 6,2 |
| | P7 | 27,8 \pm 3* | 105,8 \pm 21,2* | 69,5 \pm 5,3* | 61,5 \pm 3,4* |
| SHR | C | 21 \pm 1,8 | 87,7 \pm 13,2 [†] | 62,1 \pm 2,5 | 58,3 \pm 2,1 |
| | P1 | 25,5 \pm 2,1* | 103,6 \pm 12,1* | 65 \pm 4,7 | 64,2 \pm 3,6 |
| | P7 | 30,2 \pm 2,3* | 106, 3 \pm 12,7* | 76,2 \pm 3,8* | 67,8 \pm 1,7* |

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). C, стабилизација. P1, први минут реперфузије. P7, последњи минут реперфузије.*Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку C у групи; [†]Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку P1 у групи;

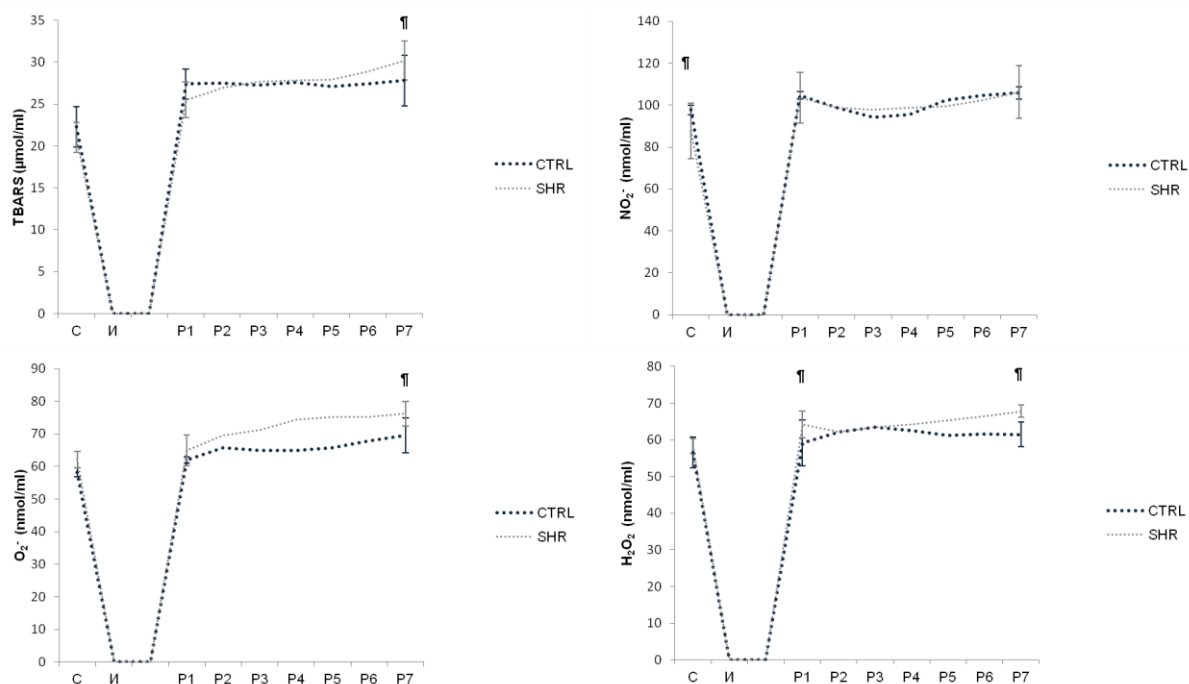


График 21. Про-оксидациони маркери у коронарном венском ефлуенту нетретираних здравих (CTRL) и спонтано-хипертензивних (SHR) пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). C-стабилизација; И-исхемија; P1-P7 вредности на сваких 5 минута током 30 минута реперфузије. †статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у тренутку од интереса између група; ‡статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ у тренутку од интереса између група.

4.10.2. Ефекти екстракта ивањског цвећа на маркере оксидационог стреса у перфузату изолованог срца здравих пацова

4.10.2.1. Ефекти 500 mg/kg екстракта ивањског цвећа на срчане про-оксидационе маркере здравих пацова

Вредности маркера оксидационог стреса приказане су табеларно и графички (Табела 29, График 22). Протоколом исхемије у трајању од 20 минута и реперфузије у трајању од 30 минута праћене су промене параметара оксидационог стреса у групи животиња које су претходно биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 500

mg/kg (500 GVE). Такође приказане су статистички значајне разлике у наведеним параметрима под утицајем 250 mg/kg екстракта у односу на контролне услове (CTRL група).

У групи која је била третирана екстрактом дошло је до смањења концентрације H_2O_2 на крају реперфузије у односу на период стабилизације, док су вредности преосталих параметара биле непромењене. Такође концентрација TBARS и NO_2^- била је значајно виша у првом минути реперфузије у односу на стабилизацију и крај реперфузије, док је концентрација O_2^- у тридесетом минути била нижа у односу на први минут реперфузије.

Третман екстрактом довео је до значајног снижења концентрације свих мерених прооксиданаса на крају реперфузије у односу на контролне услове. Такође сви маркери сем NO_2^- били су значајно нижи у првом минути реперфузије у групи изложеној екстракту, док су TBARS и O_2^- бележили ниже концентрације и у моменту стабилизације.

Табела 29. Ефекти третмана екстрактом ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg на про-оксидационе маркере у коронарном венском ефлуенту здравих пацова

| | | TBARS ($\mu\text{mol/ml}$) | NO_2^- (nmol/ml) | O_2^- (nmol/ml) | H_2O_2 (nmol/ml) |
|---------|----|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| CTRL | C | 22,3 \pm 2,4 | 97,7 \pm 14,9 | 58,3 \pm 1,3 | 56,5 \pm 4,2 |
| | P1 | 27,4 \pm 1,8* | 104,5 \pm 13,9 | 62 \pm 1 | 59,2 \pm 6,2 |
| | P7 | 27,8 \pm 3* | 105,8 \pm 21,2* | 69,5 \pm 5,3* | 61,5 \pm 3,4* |
| 500 GVE | C | 18,2 \pm 1,8 ^{¶¶} | 96,7 \pm 6,1 | 50,9 \pm 5,4 ^{¶¶} | 54,5 \pm 5,7 |
| | P1 | 24,3 \pm 1,5* [¶] | 107,9 \pm 5,2* | 54,1 \pm 3,2 ^{¶¶} | 52,4 \pm 5,1 ^{¶¶} |
| | P7 | 19,2 \pm 2,3 ^{# ¶¶} | 91,9 \pm 5,8 ^{#¶} | 50,1 \pm 2,9 ^{#¶¶} | 49,5 \pm 4* ^{¶¶} |

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). С, стабилизација. P1, први минут реперфузије. P7, последњи минут реперфузије.*Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку С у групи; #Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку P1 у групи; ¶Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на нетретиране животиње у истом тренутку од интереса.

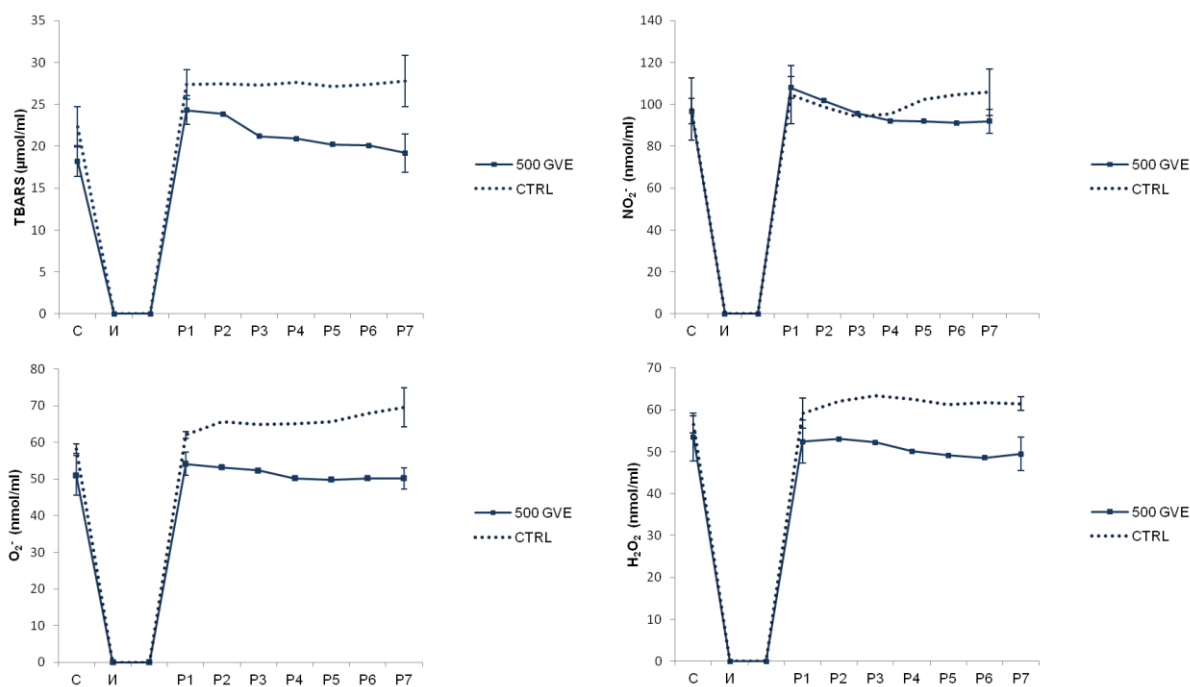


График 22. Про-оксидациони маркери у коронарном венском ефлуенту здравих пацова који су били на третману екстрактом од 500 mg/kg и нетретираних здравих пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). С-стабилизација; И-исхемија; P1-P7 вредности на сваких 5 минута током 30 минута реперфузије.

4.10.2.2. Ефекти 250 mg/kg екстракта ивањског цвећа на срчане про-оксидационе маркере здравих пацова

Вредности маркера оксидационог стреса приказане су табеларно и графички (Табела 30, График 23). Протоколом исхемије у трајању од 20 минута и реперфузије у трајању од 30 минута праћене су промене параметара оксидационог стреса у групи животиња које су претходно биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 250 mg/kg (250 GVE). Такође приказане су статистички значајне разлике у наведеним параметрима под утицајем 250 mg/kg екстракта у односу на контролне услове (CTRL група).

У групи животиња која је била изложена третману екстрактом у дози од 250 mg/kg уочене су промене вредности TBARS и NO₂⁻ током посматраног периода. Наиме

дошло је до значајног скока у концентрацији TBARS у првом и последњем минуту реперфузије у односу на период стабилизације. Такође у првом минуту реперфузије концентрација NO_2^- је била значајно виша у односу на остала два посматрана тренутка од интереса.

Примена екстракта довела је до значајног пада у концентрацији свих испитиваних про-оксиданаса сем H_2O_2 након тридесетоминутне реперфузије у односу на здраве нетретиране животиње. Такође ниже вредности TBARS и O_2^- биле су забележене у овој групи и у првом минуту реперфузије.

Табела 30. Ефекти третмана екстрактом ивањског цвећа у дози од 250 mg/kg на про-оксидационе маркере у коронарном венском ефлуенту здравих пацова

| | | TBARS ($\mu\text{mol/ml}$) | NO_2^- (nmol/ml) | O_2^- (nmol/ml) | H_2O_2 (nmol/ml) |
|---------|----|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| CTRL | C | 22,3 \pm 2,4 | 97,7 \pm 14,9 | 58,3 \pm 1,3 | 56,5 \pm 4,2 |
| | P1 | 27,4 \pm 1,8* | 104,5 \pm 13,9 | 62 \pm 1 | 59,2 \pm 6,2 |
| | P7 | 27,8 \pm 3* | 105,8 \pm 21,2* | 69,5 \pm 5,3* | 61,5 \pm 3,4* |
| 250 GVE | C | 20,2 \pm 1,13 | 93,6 \pm 1,9 | 56,8 \pm 4,2 | 54,2 \pm 4,8 |
| | P1 | 22,3 \pm 2,1* [†] | 102,3 \pm 1,2* | 57,6 \pm 3,6 [†] | 57,5 \pm 2,1 |
| | P7 | 22,6 \pm 1,21* [†] | 94,2 \pm 5,6 ^{#†} | 60,2 \pm 3,9 [†] | 58,4 \pm 4,9 |

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). C, стабилизација. P1, први минут реперфузије. P7, последњи минут реперфузије.*Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку C у групи; #Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку P1 у групи; [†]Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на нетретиране животиње у истом тренутку од интереса.

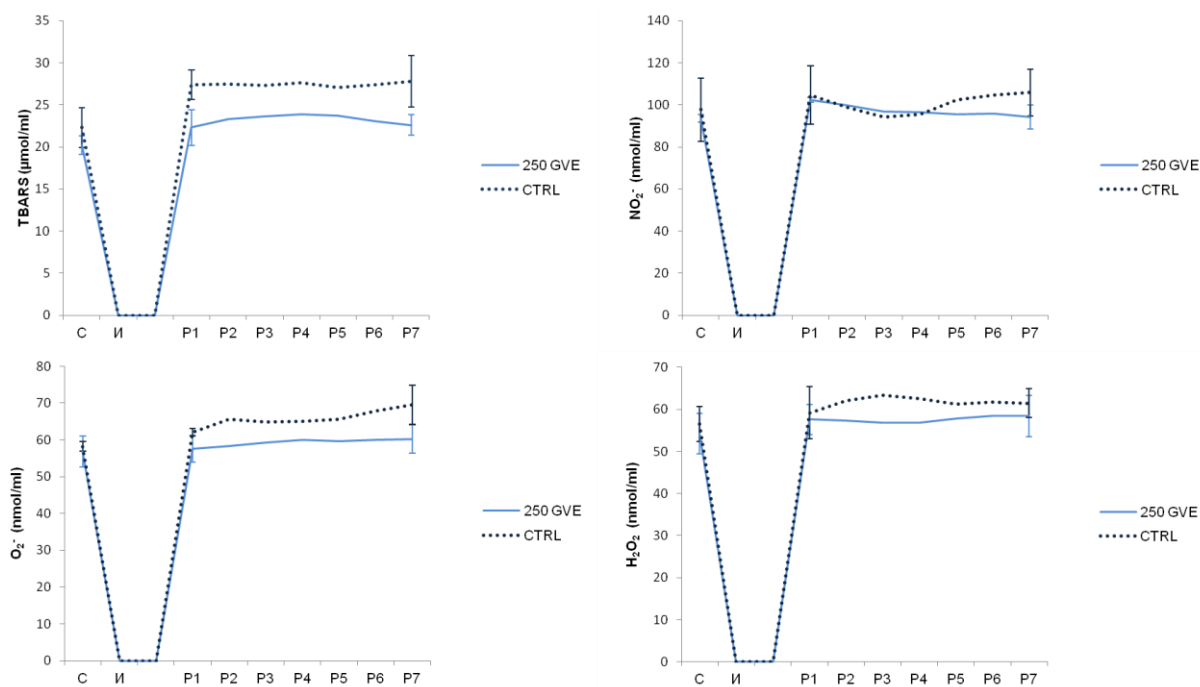


График 23. Про-оксидациони маркери у коронарном венском ефлуенту здравих пацова који су били на третману екстрактом од 250 mg/kg и нетретираних здравих пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). С-стабилизација; И-исхемија; P1-P7 вредности на сваких 5 минута током 30 минута реперфузије.

4.10.2.3. Ефекти 125 mg/kg екстракта ивањског цвећа на срчане про-оксидационе маркере здравих пацова

Вредности маркера оксидационог стреса приказане су табеларно и графички (Табела 31, График 24). Протоколом исхемије у трајању од 20 минута и реперфузије у трајању од 30 минута праћене су промене параметара оксидационог стреса у групи животиња које су претходно биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 125 mg/kg (125 GVE). Такође приказане су статистички значајне разлике у наведеним параметрима под утицајем 125 mg/kg екстракта у односу на контролне услове (CTRL група).

Након третмана екстрактом у дози од 125 mg/kg уочене су промене концентрација NO₂⁻ и O₂⁻ између посматраних тренутака. Дошло је до статистички

значајног пораста концентрације NO_2^- у првом минуту реперфузије у односу на период стабилизације. Додатно ниво O_2^- је био значајно повишен на крају реперфузије у односу на период пре исхемије и први минут реперфузије.

Ниже концентрације TBARS у првом минуту реперфузије и NO_2^- у свим тачкама од интереса биле су забележене у групи која је конзумирала екстракт у односу на контролне услове.

Табела 31. Ефекти третмана екстрактом ивањског цвећа у дози од 125 mg/kg на прооксидационе маркере у коронарном венском ефлуенту здравих пацова

| | | TBARS ($\mu\text{mol/ml}$) | NO_2^- (nmol/ml) | O_2^- (nmol/ml) | H_2O_2 (nmol/ml) |
|---------|----|------------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| CTRL | C | 22,3 ± 2,4 | 97,7 ± 14,9 | 58,3 ± 1,3 | 56,5 ± 4,2 |
| | P1 | 27,4 ± 1,8* | 104,5 ± 13,9 | 62 ± 1 | 59,2 ± 6,2 |
| | P7 | 27,8 ± 3* | 105,8 ± 21,2* | 69,5 ± 5,3* | 61,5 ± 3,4* |
| 125 GVE | C | 22,9 ± 1,1 | 92,5 ± 5,2 [¶] | 60,2 ± 5,6 | 57,2 ± 1,6 |
| | P1 | 23,4 ± 1,2 [¶] | 98,8 ± 3,9* [¶] | 60,1 ± 4,8 | 58,6 ± 5,6 |
| | P7 | 25,46 ± 3,6 | 96,4 ± 3,1 [¶] | 65,3 ± 2,8* [#] | 59,1 ± 7,2 |

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). C, стабилизација. P1, први минут реперфузије. P7, последњи минут реперфузије.*Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку C у групи; [#]Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку P1 у групи; [¶]Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на нетретирани животиње у истом тренутку од интереса.

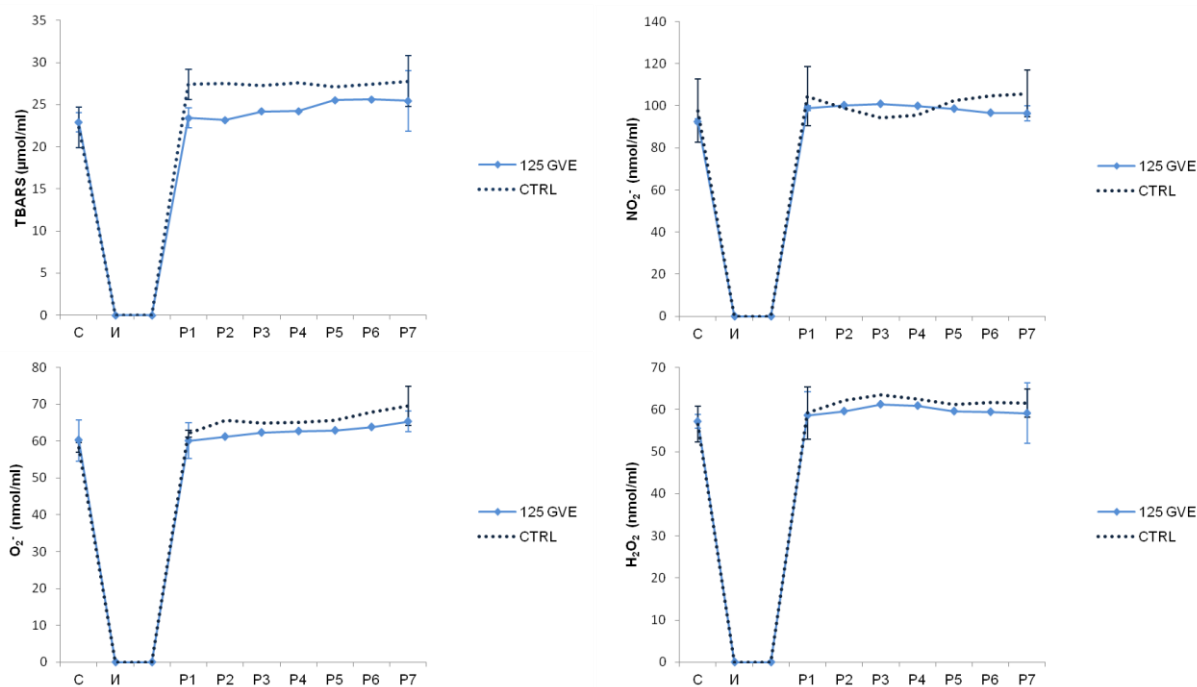


График 24. Про-оксидациони маркери у коронарном венском ефлуенту здравих пацова који су били на третману екстрактом од 125 mg/kg и нетретираних здравих пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). С-стабилизација; И-исхемија; P1-P7 вредности на сваких 5 минута током 30 минута реперфузије.

4.10.2.4. Промене срчаних про-оксидационих маркера здравих пацова у односу на примењену дозу екстракта ивањског цвећа

Разлике у вредностима прооксидационих маркера у коронарном венском ефлуенту под утицајем 500, 250 и 125 mg/kg екстракта приказане су на графику 25. Резултати су представљени у виду средњих вредности+стандардна девијација ($X \pm SD$) са статистички значајном разликом за вредност $p < 0,05$ и $p < 0,01$.

Концентрација TBARS је била значајно нижа у стабилизацији и на крају реперфузије у групи подвргнутој највишој у односу на најнижу дозу. Такође нижа вредност TBARS откривена је на крају реперфузије у групи на третману 500 mg/kg у односу на 250 mg/kg и 250 mg/kg у односу на 125 mg/kg екстракта. У групи која је користила највишу дозу концентрација NO_2^- је била значајно виша у првом минуту

реперфузије и нижа на крају реперфузије у односу на најнижу дозу. Код пацова третираних са 500 mg/kg екстракта откривен је значајно нижи ниво O_2^- у односу на остале две дозе у свим испитиваним тренуцима и H_2O_2 у првом и последњем минути реперфузије.

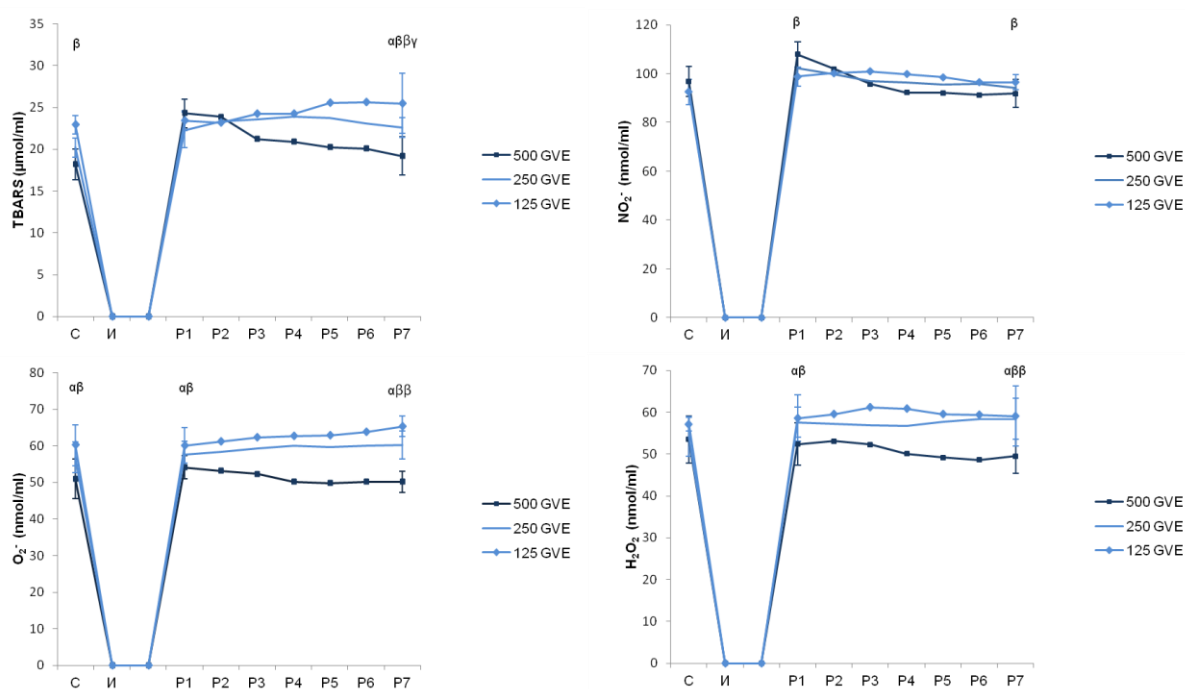


График 25. Поређење ефеката различитих доза екстракта ивањског цвећа на концентрацију срчаних прооксиданаса код здравих пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). С-стабилизација; И-исхемија; P1-P7 вредности на сваких 5 минута током 30 минута реперфузије. ^αСтатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе SHR + 500 GVE и SHR + 250 GVE у тренутку од интереса; ^βСтатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе SHR + 500 GVE и SHR + 125 GVE; ^{ββ}Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ између групе SHR + 500 GVE и SHR + 125 GVE; ^γСтатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе SHR + 250 GVE и SHR + 125 GVE;

4.10.3. Ефекти екстракта ивањског цвећа на маркере оксидационог стреса у перфузату изолованог срца спонтано-хипертензивних пацова

4.10.3.1. Ефекти 500 mg/kg екстракта ивањског цвећа на срчане про-оксидационе маркере спонтано-хипертензивних пацова

Вредности маркера оксидационог стреса приказане су табеларно и графички (Табела 32, График 26). Протоколом исхемије у трајању од 20 минута и реперфузије у трајању од 30 минута праћене су промене параметара оксидационог стреса у групи спонтано-хипертензивних животиња које су претходно биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg (SHR + 500 GVE). Такође приказане су статистички значајне разлике у наведеним параметрима под утицајем 500 mg/kg екстракта у односу на контролне услове (SHR група).

Примена екстракта у највишој дози довела је скока у концентрацији NO_2^- у првом минуту реперфузије и пада у концентрацијама O_2^- и H_2O_2 на крају реперфузије у односу на период стабилизације. Такође ниво O_2^- је био нижи на крају тридесетоминутне реперфузије и у односу на први минут повратка протока.

Третман екстрактом у дози од 500 mg/kg довео је до значајног снижења концентрације TBARS, O_2^- и H_2O_2 на крају реперфузије у односу на нетретиране хипертензивне животиње.

Табела 32. Ефекти третмана екстрактом ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg на про-оксидационе маркере у коронарном венском ефлуенту спонтано-хипертензивних пацова

| | | TBARS ($\mu\text{mol/ml}$) | NO_2^- (nmol/ml) | O_2^- (nmol/ml) | H_2O_2 (nmol/ml) |
|------------------|----|------------------------------|---------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| SHR | C | 21 \pm 1,8 | 87,7 \pm 3,2 | 62,1 \pm 2,5 | 58,3 \pm 2,1 |
| | P1 | 25,5 \pm 2,1 | 103,6 \pm 2,1 | 65 \pm 4,7 | 64,2 \pm 3,6 |
| | P7 | 30,2 \pm 2,3 | 106,3 \pm 3,2 | 70,2 \pm 3,8 | 67,8 \pm 1,7 |
| SHR + 500 GVE | C | 22,9 \pm 1,4 | 94,5 \pm 6,1 | 56,9 \pm 5,5 | 57,7 \pm 5,7 |
| | P1 | 23,3 \pm 1,9 | 100,9 \pm 4,1* | 59,2 \pm 5,4 | 53,41 \pm 5,1 [†] |
| | P7 | 22,3 \pm 0,4 ^{††} | 97,2 \pm 5,8 | 50,1 \pm 2,9 ^{*#††} | 50,5 \pm 4,1 ^{*††} |

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). C, стабилизација. P1, први минут реперфузије. P7, последњи минут реперфузије.*Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку C у групи; #Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку P1 у групи; [†]Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на нетретираних животиње у истом тренутку од интереса.

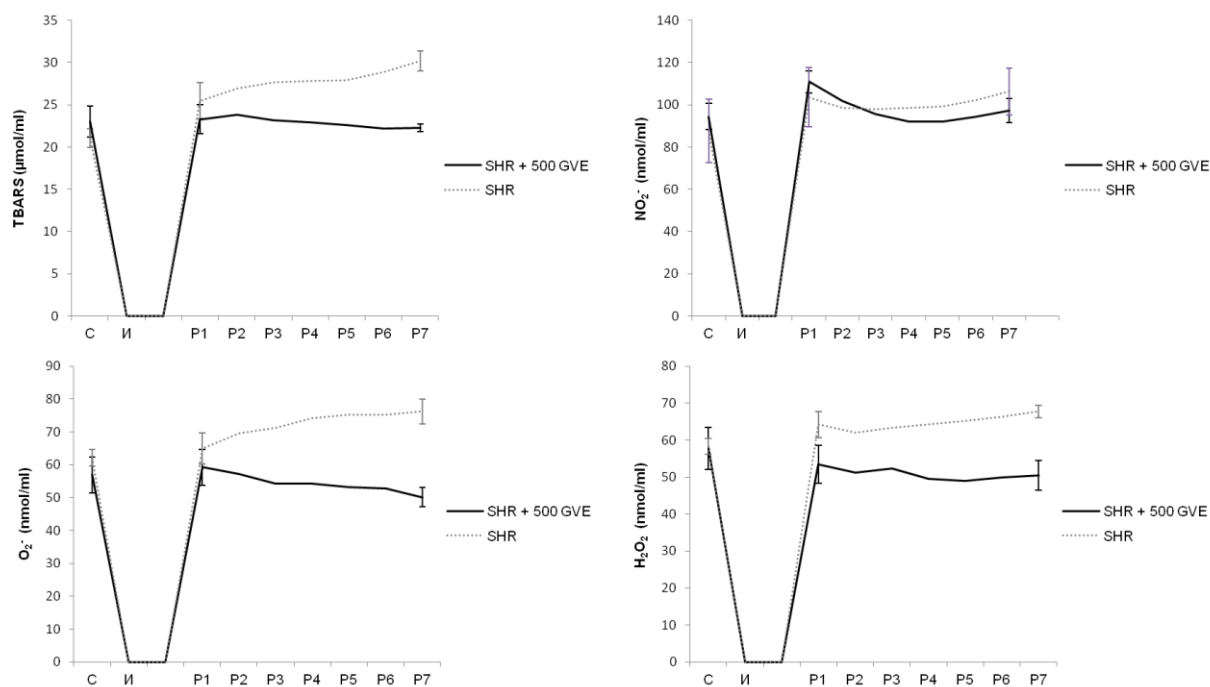


График 26. Про-оксидациони маркери у коронарном венском ефлуенту спонтано-хипертензивних пацова који су били на третману екстрактом од 500 mg/kg и нетретираних хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). С-стабилизација; И-исхемија; P1-P7 вредности на сваких 5 минута током 30 минута реперфузије.

4.10.3.2. Ефекти 250 mg/kg екстракта ивањског цвећа на срчане про-оксидационе маркере спонтано-хипертензивних пацова

Вредности маркера оксидационог стреса приказане су табеларно и графички (Табела 33, График 27). Протоколом исхемије у трајању од 20 минута и реперфузије у трајању од 30 минута праћене су промене параметара оксидационог стреса у групи спонтано-хипертензивних животиња које су претходно биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 250 mg/kg (SHR + 250 GVE). Такође приказане су статистички значајне разлике у наведеним параметрима под утицајем 500 mg/kg екстракта у односу на контролне услове (SHR група).

Третман екстрактом у дози од 250 mg/kg довео је до повећања концентрације NO₂⁻ и O₂⁻ на крају реперфузије у односу на период пре исхемије, док су концентрације TBARS и H₂O₂ биле непромењене током испитиваног периода.

Примена екстракта довела је до пада у концентрацији свих испитиваних параметара на крају реперфузије у односу на нетретиране контролне животиње. Додатно уочене су и ниже концентрације NO₂⁻, O₂⁻ и H₂O₂ у првом минуту реперфузије, а O₂⁻ и у стабилизацији.

Табела 33. Ефекти третмана екстрактом ивањског цвећа у дози од 250 mg/kg на про-оксидационе маркере у коронарном венском ефлуенту спонтано-хипертензивних пацова

| | | TBARS (μmol/ml) | NO ₂ ⁻ (nmol/ml) | O ₂ ⁻ (nmol/ml) | H ₂ O ₂ (nmol/ml) |
|------------------|----|-------------------------|--|---------------------------------------|---|
| SHR | C | 21 ± 1,8 | 87,7 ± 3,2 | 62,1 ± 2,5 | 58,3 ± 2,1 |
| | P1 | 25,5 ± 2,1 | 103,6 ± 2,1 | 65 ± 4,7 | 64,2 ± 3,6 |
| | P7 | 30,2 ± 2,3 | 106,3 ± 3,2 | 70,2 ± 3,8 | 67,8 ± 1,7 |
| SHR + 250 GVE | C | 23,2 ± 1,2 | 90,2 ± 1,69 | 57,8 ± 1,2 [¶] | 56,6 ± 2,3 |
| | P1 | 25,6 ± 2,3 | 95,6 ± 5,6 [¶] | 60,2 ± 5,9 [¶] | 58,4 ± 7,1 [¶] |
| | P7 | 25,2 ± 1,9 [¶] | 100,2 ± 4,9* | 63,4 ± 4,4* [¶] | 56,8 ± 4,9 [¶] |

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X ± SD). C, стабилизација. P1, први минут реперфузије. P7, последњи минут реперфузије.*Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку C у групи; [#]Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку P1 у групи; [¶]Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на нетретиране животиње у истом тренутку од интереса.

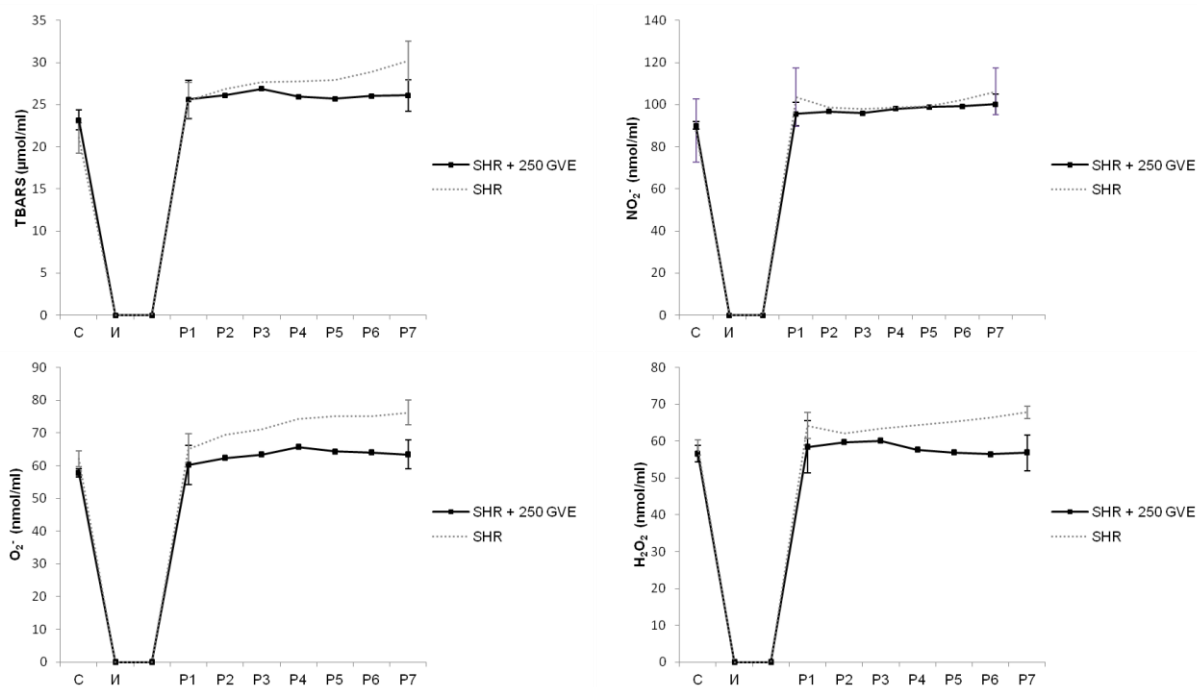


График 27. Про-оксидациони маркери у коронарном венском ефлуенту спонтано-хипертензивних пацова који су били на третману екстрактом од 250 mg/kg и нетретираних хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). С-стабилизација; И-исхемија; P1-P7 вредности на сваких 5 минута током 30 минута реперфузије.

4.10.3.3. Ефекти 125mg/kg екстракта ивањског цвећа на срчане про-оксидационе маркере спонтано-хипертензивних пацова

Протоколом исхемије (20 мин) и реперфузије (30 мин) праћене су промене параметара оксидационог стреса у групи хипертензивних животиња на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 125 mg/kg (SHR+ 125 GVE). Вредности маркера оксидационог стреса приказане су табеларно и графички (Табела 34, График 28).

У групи која је конзумирала 125 mg/kg екстракта дошло је до значајног скока у концентрацији свих испитиваних параметара на крају реперфузије у односу на стабилизациони период. Додатно откривена је виша концентрација TBARS у P1 у односу на С, као и NO₂⁻ и H₂O₂ у P7 у односу на P1.

Након примене екстракта уочавају се смањене концентрације TBARS на крају реперфузије и повишене NO_2^- у периоду стабилизације у односу на хипертензивну контролну групу. Такође код третираних пацова забележена је нижа концентрација O_2^- у свим тренуцима од интереса.

Табела 34. Ефекти третмана екстрактом ивањског цвећа у дози од 125 mg/kg на про-оксидационе маркере у коронарном венском ефлуенту спонтано-хипертензивних пацова.

| | | TBARS ($\mu\text{mol/ml}$) | NO_2^- (nmol/ml) | O_2^- (nmol/ml) | H_2O_2 (nmol/ml) |
|------------------|----|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| SHR | C | 21 \pm 1,8 | 87,7 \pm 3,2 | 62,1 \pm 2,5 | 58,3 \pm 2,1 |
| | P1 | 25,5 \pm 2,1 | 103,6 \pm 2,1 | 65 \pm 4,7 | 64,2 \pm 3,6 |
| | P7 | 30,2 \pm 2,3 | 106,3 \pm 3,2 | 70,2 \pm 3,8 | 67,8 \pm 1,7 |
| SHR + 125 GVE | C | 22,2 \pm 1,5 | 93,5 \pm 2,5 [¶] | 56,9 \pm 2,3 [¶] | 59,5 \pm 4,5 |
| | P1 | 27,8 \pm 3,6* | 98,5 \pm 4,9 | 59,6 \pm 6,5 [¶] | 60,2 \pm 6,8 |
| | P7 | 26,1 \pm 2,8* [¶] | 107,1 \pm 8,9* [#] | 61,2 \pm 7,2* [¶] | 66,6 \pm 9,2* [#] |

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). C, стабилизација. P1, први минут реперфузије. P7, последњи минут реперфузије.*Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку C у групи; [#]Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку P1 у групи; [¶]Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на нетретиране животиње у истом тренутку од интереса.

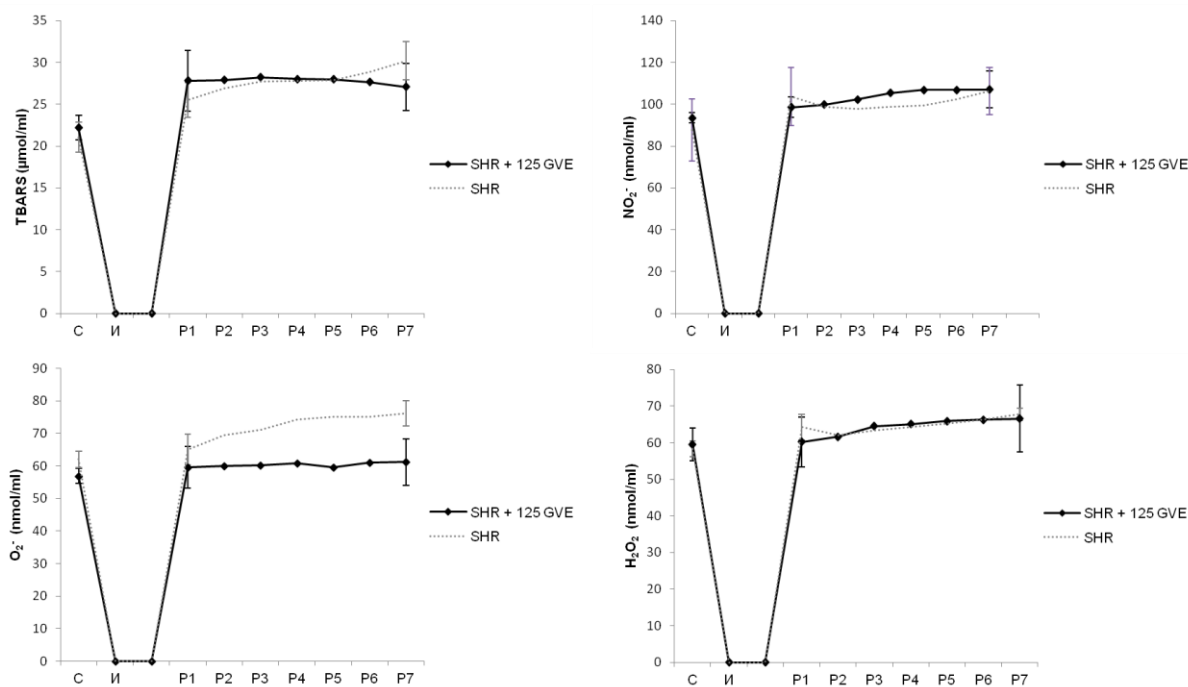


График 28. Про-оксидациони маркери у коронарном венском ефлуенту спонтано-хипертензивних пацова који су били на третману екстрактом од 125 mg/kg и нетретираних хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). С-стабилизација; И-исхемија; P1-P7 вредности на сваких 5 минута током 30 минута реперфузије.

4.10.3.4. Промене срчаних про-оксидационих маркера спонтано-хипертензивних пацова у односу на примењену дозу екстракта ивањског цвећа

Разлике у вредностима прооксидационих маркера у коронарном венском ефлуенту хипертензивних пацова под утицајем 500, 250 и 125 mg/kg екстракта приказане су на графику 29. Резултати су представљени у виду средњих вредности+стандардна девијација ($X \pm SD$) са статистички значајном разликом за вредност $p < 0,05$ и $p < 0,01$ између група хипертензивних пацова на третману различитим дозама екстракта.

Статистички значајна разлика између пацова који су користили највишу дозу у односу на остале две дозе уочава се у концентрацијама свих испитиваних прооксиданаса. Наиме третман у дози од 500 mg/kg био је повезан са значајно нижим концентрацијама свих параметара на крају реперфузије у односу на дозу од 125 mg/kg и

нижим концентрацијама TBARS, O_2^- и H_2O_2 у односу на дозу од 250 mg/kg. Такође TBARS и H_2O_2 су били нижи у групи изложеној највишој дози у првом минуту реперфузије у односу на најнижу дозу, док је H_2O_2 били нижи у односу на дозу од 250 mg/kg. У групи на третману 500 mg/kg екстракта откривен је скок у нивоу NO_2^- у првом минуту реперфузије у односу на друге две групе. Разлика између пацова који су користили 250 и 125 mg/kg екстракта уочава се у вредности параметара H_2O_2 и NO_2^- по завршетку реперфузије који су били значајно нижи у групи која је користила 250 mg/kg екстракта.

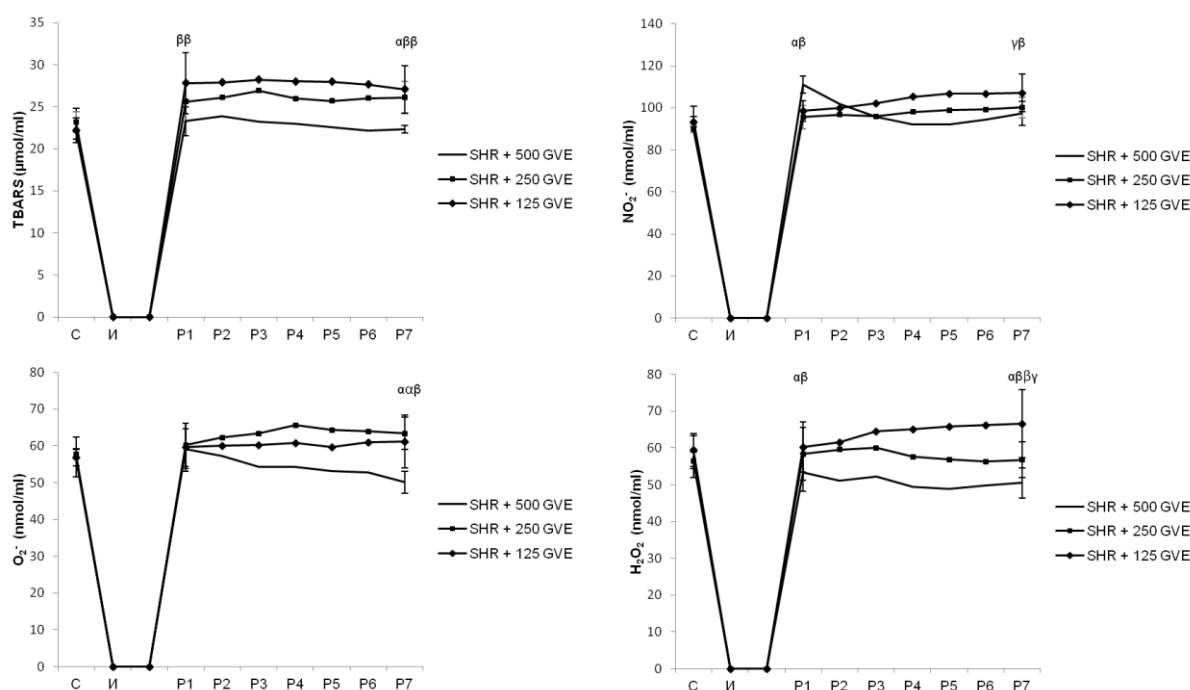


График 29. Поређење ефеката различитих доза екстракта ивањског цвећа на концентрацију про-оксидационих маркера у коронарном венском ефлуенту спонтано-хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). С-стабилизација; И-исхемија; P1-P7 вредности на сваких 5 минута током 30 минута реперфузије. $^{\alpha}$ Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе SHR + 500 GVE и SHR + 250 GVE у тренутку од интереса; $^{\beta}$ Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе SHR + 500 GVE и SHR + 125 GVE; $^{\beta\beta}$ Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ између групе SHR + 500 GVE и SHR + 125 GVE; $^{\gamma}$ Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе SHR + 250 GVE и SHR + 125 GVE;

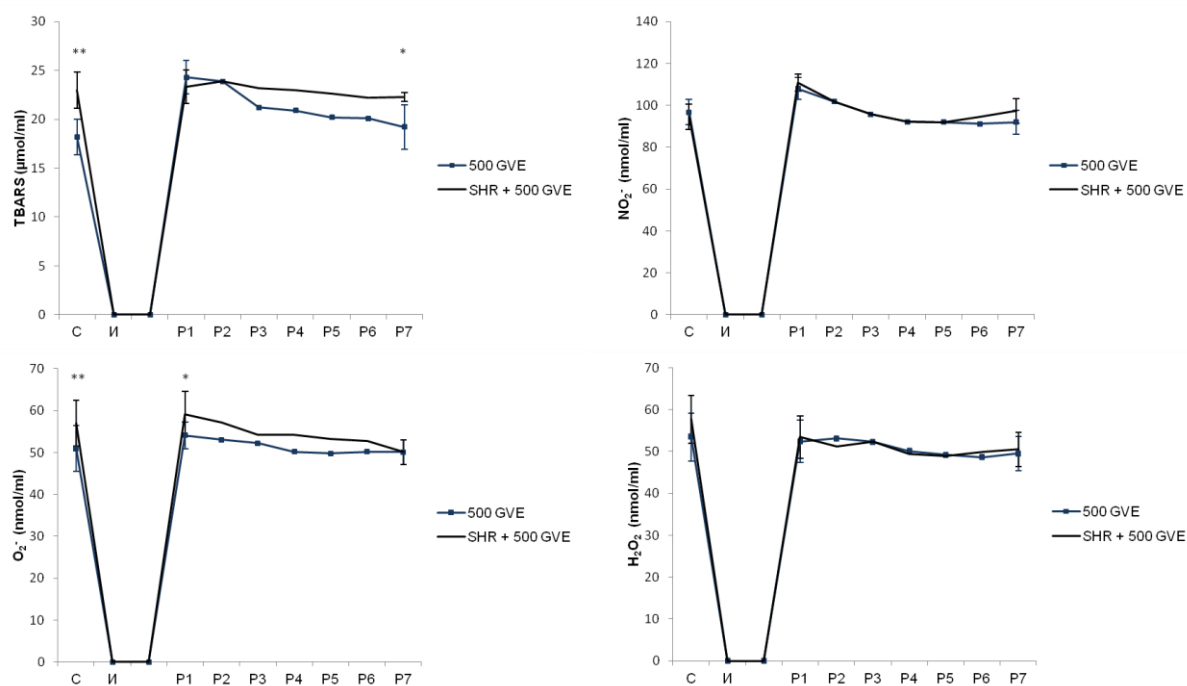
4.10.4. Разлике у ефектима екстракта ивањског цвећа на срчане прооксидантне маркере код здравих и спонтано-хипертензивних пацова

Промене вредности срчаних прооксиданаса у групи нормотензивних и спонтано-хипертензивних животиња под утицајем различитих доза екстракта приказане су графички (График 30, 31 и 32). Резултати су представљени у виду средњих вредности+стандардна девијација ($X\pm SD$) са статистички значајном, односно статистички високо значајно разликом за вредност $p<0,05$, односно $p<0,01$ између нормотензивних и хипертензивних животиња на третману истом дозом екстракта у тачакама од интереса.

У групи хипертензивних животиња које су биле изложене екстракту у дози од 500 mg/kg забележене су: више концентрације TBARS у тренутку стабилизације и на крају реперфузије и O_2^- у тренутку стабилизације и првом минуту реперфузије (График 30).

Једина разлика која је забележена између групе хипертензивних и нормотензивних пацова који су били изложене екстракту у дози од 250 mg/kg била је виша концентрација TBARS код хипертензивних пацова у свим тачакама од интереса и O_2^- на крају реперфузије (График 31).

У групи хипертензивних животиња које су биле изложене екстракту у дози од 125 mg/kg забележене су: виша концентрација TBARS у првом минуту реперфузије и виша концентрација NO_2^- и H_2O_2 на крају реперфузије (График 32).



Графикон 30. Поређење ефеката 500 mg/kg екстракта ивањског цвећа на срчане прооксидантне маркере нормотензивних и спонтано-хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). С-стабилизација; И-исхемија; P1-P7 вредности на сваких 5 минута током 30 минута реперфузије. *Статистички значајна разлика између група 500 GVE и SHR+500 GVE; ** статистички високо значајна разлика између група 500 GVE и SHR+500 GVE.

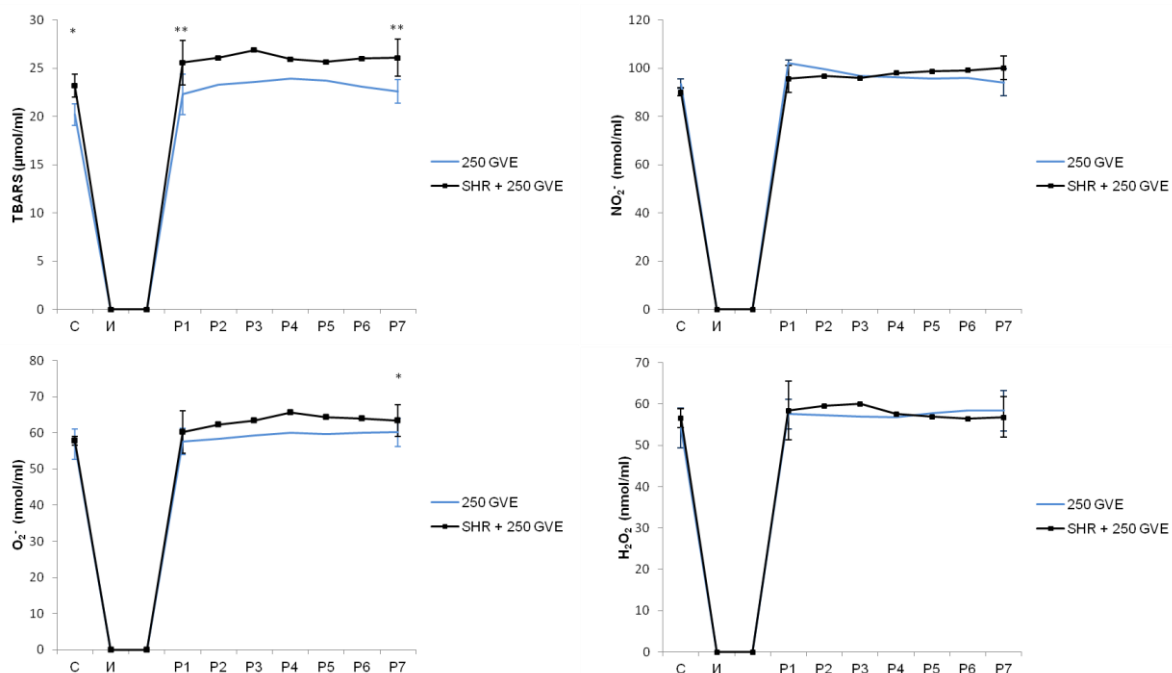


График 31. Поређење ефеката 250 mg/kg екстракта ивањског цвећа на срчане прооксидантне маркере нормотензивних и спонтано-хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). С-стабилизација; И-исхемија; P1-P7 вредности на сваких 5 минута током 30 минута реперфузије. *Статистички значајна разлика између група 500 GVE и SHR+500 GVE; ** статистички високо значајна разлика између група 500 GVE и SHR+500 GVE.

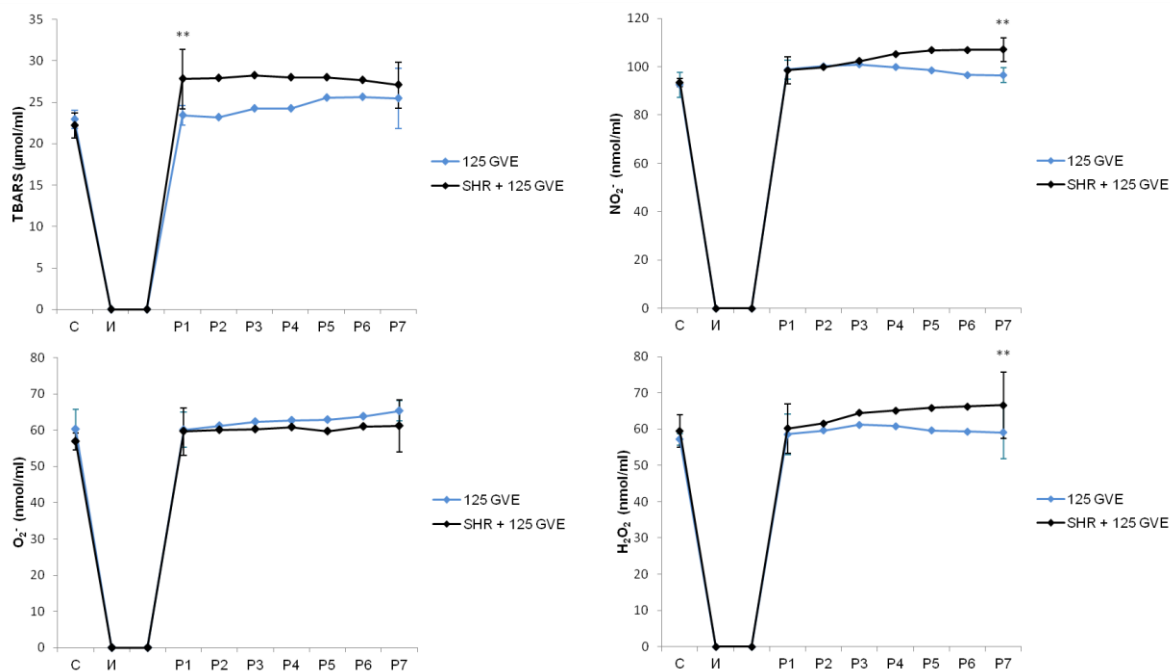
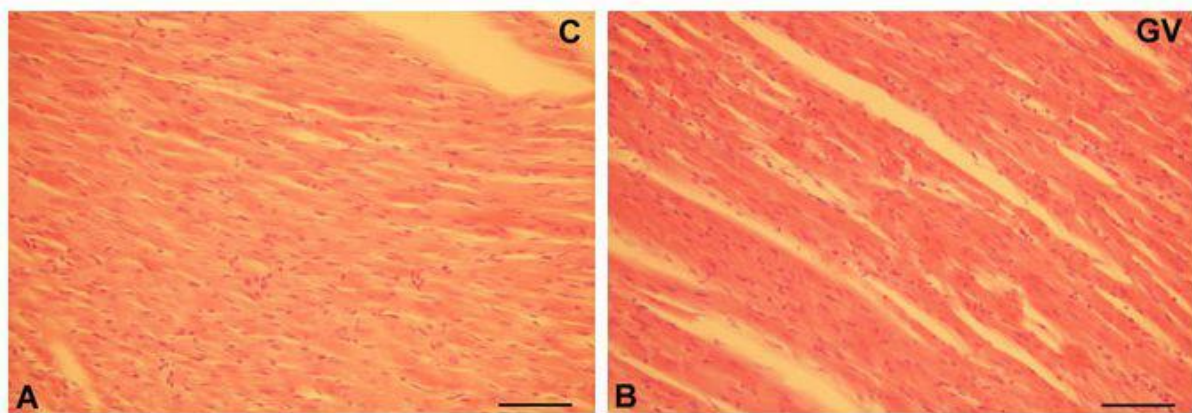


График 32. Поређење ефеката 125 mg/kg екстракта ивањског цвећа на срчане прооксидантне маркере нормотензивних и спонтано-хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). С-стабилизација; И-исхемија; P1-P7 вредности на сваких 5 минута током 30 минута реперфузије. *Статистички значајна разлика између група 500 GVE и SHR+500 GVE; ** статистички високо значајна разлика између група 500 GVE и SHR+500 GVE.

4.11. Ефекти екстраката ивањског цвећа на очуваност грађе органа пацова

4.11.1. Ефекти екстраката ивањског цвећа на очуваност грађе срца здравих пацова након исхемије-реперфузије

Грађа срца нетретираних животиња као и животиња које су биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg након излагања протоколу И-Р приказана је на слици 9.

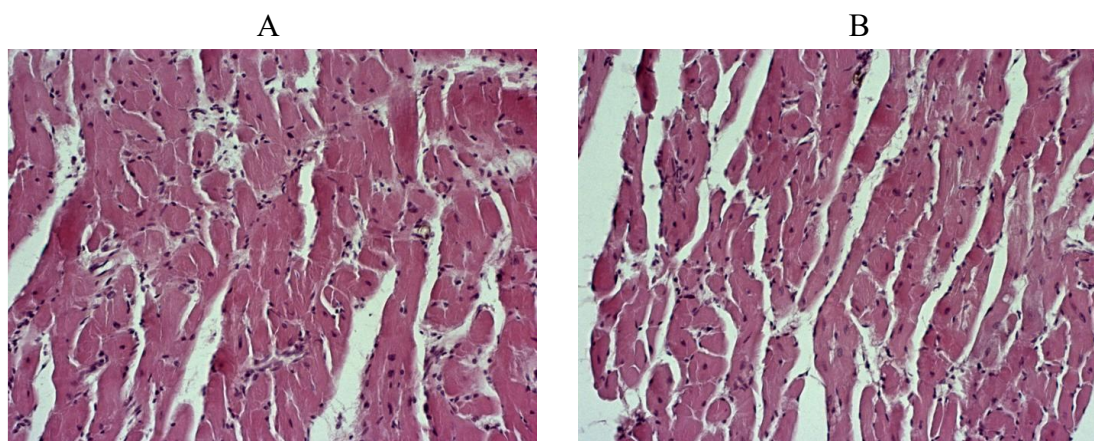


Слика 9. Хистопатолошке промене у срцу пацова (увећање, x 400): А- CTRL група; В- 500 GVE група.

На срцу нетретираних животиња (Слика 9А) уочена је хипереозинофилија већине мишићних влакана, са губитком једара и попречне испруганости, праћена појавом “contraction“ bands, едема и вакуолозације мишићних влакана. С друге стране, анализом срчаног ткива третираних пацова уочава се хипереозинофилија, умерено едематозна срчана мишићна влакна, без губитка једара и попречне испруганости (Слика 9В).

4.11.2. Ефекти екстраката ивањског цвећа на очуваност грађе срца спонтано-хипертензивних пацова након исхемије-реперфузије

Грађа срца нетретираних спонтано-хипертензивних животиња као и спонтано-хипертензивних животиња које су биле на третману екстрактом ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg након излагања протоколу И-Р приказана је на слици 10.



Слика 10. Хистопатолошке промене у срцу спонтано-хипертензивних пацова (оригинално увећање, x 200): **А-** SHR група; **В-** SHR + 500 GVE група.

На серијским пресецима исечака миокарда спонтано-хипертензивних пацова који су били на третману екстрактом у највишој дози као и нетретираних пацова, хистолошки доминира хипертрофија мишићних влакана, едем, ретки фокуси хиперцелуларног интерстицијума моноклеарног и фиброцитно-фибробластног типа, некроза и дегенеративне промене. Дегенеративне промене су израженије у групи нетретираних пацова и укључују зоналне некрозе већег броја кардиомиоцита, са хипереозинофилијом, фрагментацијом влакана и губитком једара. У групи пацова који су били на третману уочене су фокалне некрозе и захватају мањи број кардиомиоцита или су уницелуларне.

5. ДИСКУСИЈА

Избор ивањског цвећа као биљног материјала у овој докторској дисертацији заснован је на његовој широко распрострањеној традиционалној употреби кроз историју, па самим тим и могућој имплементацији као терапеутског средства у савременој медицини. Коришћена је екстракција под рефлуксом као метод добијања екстракта због раније утврђене предности над осталим техникама екстракције, која се огледа у повећаној растворљивости фенола и флавоноида у екстракционом растварачу на вишим температурама (26).

5.1. Хемијски састав екстракта ивањског цвећа

Будући да се фармаколошко деловање екстракта заснива на адитивној или синергистичкој активности једињења која улазе у његов састав, први циљ ове докторске дисертације био је да се изврши хемијска карактеризација воденог, метанолног и ацетонског екстракта ивањског цвећа. LC-DAD-MS/MS анализа коришћена је за одређивање квантитативне и квалитативне заступљености биомолекула у испитиваним екстрактима. Потврђено је присуство различитих биоактивних молекула, док су најзаступљенија једињења у свим екстрактима била: хлорогенска киселина, цинарозид, изокверцетин и р-кумаринска киселина. Ова анализа је пружила информација да су вода, метанол и ацетон екстраховали сличне биомолекуле, али у различитим количинама, у зависности од њихове растворљивости. Најважнији фактори који утичу на растворљивост полифенола су присуство и положај хидроксилних група, величина молекула и дужина угљоводоничних ланаца (147). Испитивањем укупног фенолног и флавоноидног садржаја откривен је највећи садржај фенола у воденом, а флавоноида у метанолном екстракту. Екстракт са највишим садржајем флавоноида, односно у овом случају метанолни, коришћен је за испитивање кардиопротективне и антиинфламацијске активности ивањског цвећа.

5.2. Способност неутрализације DPPH· радикала екстраката ивањског цвећа

Конверзија стабилног слободног DPPH· радикала у 1,1-дифенил-2-пикрилхидразин у присуству антиоксиданаса представља погодан, тачан и широко коришћен метод за испитивање способности природних једињења да неутралишу слободне радикале (148, 149). Резултати ове студије јасно указују на то да испитивани екстракти показују антиоксидациони потенцијал, што се може приписати синергистичким ефектима идентификованих биолошки активних једињења као што су феноли, флавоноиди (150). Антиоксидациона активност метанолног и воденог екстракта ивањског цвећа била је виша у односу на коришћени стандард ВНТ. Наши налази су у корелацији са резултатима других аутора који су открили да метанолни екстракт *G. verum* такође може да неутралише DPPH радикал уз IC 50 вредност од 8,04 µg/ml (2). Међутим у истраживању спроведеном од стране других аутора метанолни екстракт ивањског цвећа, добијен ултразвучном екстракцијом, показао је значајно нижу способност неутралисања DPPH радикала (IC 50 = 26,97 ± 1,21 µg/ml) у односу на наш метанолни екстракт. Једно од објашњења за нижи антиоксидациони потенцијал је могућа оксидација и деградација неких антиоксидативних супстанци током сонификације (147, 41). Додатно, метанолни екстракт *G. verum* сакупљен у Ирану испољио је мањи потенцијал за ублажавање оксидационог стреса (IC 50 вредност била је 59,6 ± 0,04 µg/ml) у поређењу са метанолним екстрактом тестираним у нашој студији. Поред чињенице да су биљне врсте сакупљене са различитих локалитета, ова дискрепанца у резултатима је логична имајући у виду да су аутори студије екстраховали биљни материјал процесом мацерације на собној температури. Насупрот томе, екстракција под рефлуксом која је коришћена у нашој студији се сматра једном од најефикаснијих техника за изолацију антиоксидантних компоненти из биљних врста (55, 151). Поређењем различитих врсти из рода *Galium* запажено је да се *G. verum* издваја по изузетној антиоксидационој активности и већем садржају флавоноида као природних антиоксиданаса у односу на *G. molugo*, *G. odoratum* и *G. aparine* (20).

Имајући у виду да биолошка активност екстраката највише зависи од поларитета екстракционог растварача, циљ ове докторске дисертације је био и да се упореди антиоксидациону активност метанолног, воденог и ацетонског екстракта ивањског цвећа. Наши резултати су показали да највећу активност неутралисања DPPH поседује

метанолни, док је најнижа активност ацетонског екстракта. Овај резултат је делимично очекиван пошто је већ познато да метанол има већу способност да екстракује антиоксидантне супстанце, као што су феноли, у поређењу са водом и ацетоном. Неколико студија потврђује чињеницу да се највећа антиоксидативна активност може остварити ако се метанол користи као растварач (152). До сада није било истраживања која би указала на разлику у активности метанолног, воденог и ацетонског екстракта надземних делова ивањског цвећа ка „чишћењу“ DPPH радикала. Доступни подаци сугеришу на предност воде у односу на метанол када је реч о *in vitro* неутрализацији DPPH екстракта, док се већа способност инхибиције пероксидације постиже метанолом (57).

5.3. Антимикробна активност екстракта ивањског цвећа

Обзиром на растућу инциденцу инфективних болести и резистенцију на доступне лекове, бројна истраживања су усмерена ка открићу нових агенаса са антимикробним својствима. Главни изазов у глобалној здравственој заштити је откриће нових, ефикасних и приступачних антиинфективних агенаса, а лековито биље се истиче као драгоцен извор бројних компонената са траженим карактеристикама (153). Лековите биљке и биљни екстракти као антимикробни агенси налазе се у жижи научног интересовања због своје безбедности, доступности и ниске цене. Такође применом једињења природног порекла могуће је превазићи јавно здравствени проблем резистенције микроорганизама на најчешће коришћене синтетске лекове (154).

На антимикробну активност једињења из биљака утичу бројни фактори као што су: генотип, услови средине, време прикупљања биљне врсте, услови чувања, географска локација и услови екстракције (155). И поред широке традиционалне примене ивањског цвећа, његов антимикробни потенцијал је недовољно истражен. Ефикасност ивањског цвећа у третману инфективних болести је научно потврђена, али утицај раствара различите поларности на антимикробна својства екстракта није довољно познат.

Како би се утврдило на који начин растварачи различите поларности утичу на карактеристике екстракта, испитиван је антибактеријски и антигљивични потенцијал воденог, ацетонског и метанолног екстракта ивањског цвећа. Наши резултати указују на умерену антибактеријску активност екстракта према већини испитиваних сојева,

при чему није било разлике у активности према грам позитивним и грам негативним бактеријама. Интензитет антимикробне активности зависио је од врсте микроорганизама, при чему је запажена највећа сензитивност *Bacillus subtilis* ATCC 6633 према сва три типа екстракта, са израженијом активношћу метанолног и ацетонског. Такође по осетљивости на сва три екстракта се издвајају и *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и *Salmonella enterica*. Додатно, антигљивична активност је била генерално слаба према већини квасница и филаментозних гљива са изузетком *Aspergillus niger* ATCC која је осетљивија на ацетонски екстракт у односу на стандардни антифунгални лек флуконазол. Интензивнија антимикробна активност уочена код ацетонског екстракта може се објаснити способношћу ацетона да екстрахује широк спектар једињења различите поларности која испољавају ефекат на патогене сојева (153).

За разлику од планктонских микроорганизама који функционишу као индивидуалне станице, велики проблем на пољу инфективних болести представља формирање биофилма. Већина бактерија, гљива итд је способна да адхерира на биотичку и абиотичку површину и награди биофилм који показује другачије фенотипске карактеристике у односу на планктонске микроорганизме. Опасност формирања биофилма проистиче из чињенице да су бактерије унутар биофилма 10-1000 пута отпорније на антибиотике у односу на планктонске микроорганизме (156, 157). Будући да контрола сесилне заједнице представља изазов у терапији инфективних болести, наш циљ је био да испита и потенцијал екстракта да утиче на настајање биофилма, као и на већ формирану биофилм *B. subtilis* ATCC 6633 и *P. mirabilis* ATCC 12453. Уочили смо највећу ефикасност воденог екстракта према формирању биофилма наведених бактерија при концентрацији од 5 mg/ml и на формирану биофилм *P. mirabilis* ATCC 12453 при концентрацији од 5.47 mg/ml.

Испитивањем ефеката метанолног и хлороформског екстракта ивањског цвећа са територије Турске према хуманим патогеним клиничким изолатима *Candida albicans* уочено је да они не показују антигљивичну активност, што је у сагласности са резултатима нашег истраживања (54). Такође проучавани су ефекти воденог, алкохолног (70%) и хлороформског екстракта ивањског цвећа против следећих сојева бактерија: *Staphylococcus aureus* 15923, *Escherichia coli* 25922, *Pseudomonas aeruginosa* 2789, *Bacillus subtilis* 6633 и *Proteus vulgaris* 4636. Користећи диск дифузиону методу аутори су потврдили значајан антибактеријски потенцијал хлороформског екстракта у концентрацијама од 20 и 50 g/l према свим испитиваним врстама, а дијаметар

инхибиције зоне раста је износио: $30,3 \pm 0,4$ и $32,4 \pm 0,3$ mm против соја *Staphylococcus aureus*, $12,0 \pm 0,1$ и $13,2 \pm 0,2$ mm против соја *Escherichia coli*, $21,2 \pm 0,2$ и $20,2 \pm 0,3$ mm против соја *Pseudomonas aeruginosa*, $20,2 \pm 0,3$ и $30,3 \pm 0,4$ против соја *Bacillus subtilis* и $16,1 \pm 0,3$ и $15,1 \pm 0,2$ против соја *Proteus vulgaris*, редом. С друге стране, водени и алкохолни (70%) екстракт нису показали активност према испитиваним бактеријама. Такође у оквиру исте студије откривено је да су сојеви *Bacillus subtilis* 6633 и *Staphylococcus aureus* 15923 изузетно осетљиви на липофилни комплекс ивањског цвећа, што је у корелацији са нашим резултатима. Дијаметар зоне инхибиције раста за *Staphylococcus aureus* 15923 износио је $32,4 \pm 0,3$, а за *Bacillus subtilis* 6633 $30,3 \pm 0,4$ (52). Ова група аутора предлаже генерално слабу активност према према соју *Candida albicans*.

Додатно, проучавањем антибактеријских ефеката етанолног екстракта ивањског цвећа откривено је да је инхибиторна активност углавном усмерена према грам-позитивним бактеријама (*S. aureus* и *L. monocytogenes*) и у мањем степену према грам-негативним бактеријама (*S. typhimurium*, *E. coli*). Екстракт ове биљне врсте показао је умерену антибактеријску активност против *L. monocytogenes* (дијаметар инхибиције 16 mm) и ограничену активност према осталим тестираним патогенима. Дијаметри зоне инхибиције износили су: за *S. aureus* $11 \pm 0,05$, *E. coli* $10 \pm 0,05$ и *S. Typhimurium* $12 \pm 0,05$. Такође у овом експерименту је откривено да етанолни екстракт ивањског цвећа испоњава слабу антифунгалну активност против *C. albicans*, са дијаметром зоне инхибиције раста $15 \pm 0,05$ (20).

Резултати истраживања спроведеног од стране *Quave* и сарадника 2008. године указује на то да етанолни екстракт ивањског цвећа са подручја Италије није имао ефекта на раст и настанак биофилма метицилин резистентног *Staphylococcus aureus*-а (158). Према нашим досадашњим сазнањима, не постоје подаци о антибиофилм активности воденог, метанолног и ацетонског екстракта ивањског цвећа, као ни о њихових могућим разликама. Резултати ове докторске дисертације су први који пружају увид у предност воденог екстракта са аспекта инхибиторне активност према настанку биофилма.

Многобројне студије сведоче о употреби биљака како у циљу спречавања раста микроба, тако и због побољшања квалитета и безбедности хране. Биоактивна једињења из групе флавоноида, алкалоида, лектина, терпеноида се сматрају заслужнима за директни и индиректни антимикуробни ефекат биљних врста (103, 159, 160). И поред великог броја истраживања која потврђују антимикуробни потенцијал флавоноида, тачан

механизам којим остварују ефекат на микроорганизме и даље остаје непознаница (161). Сматра се да механизми одговорни за директни антибактеријски ефекат флавоноида: инхибиција синтезе нуклеинских киселина, инхибиција функционисања цитоплазматске мембране, инхибиција енергетског метаболизма (161-163). Извештаји сугеришу да се инхибиторни ефекат једињења из групе флавоноида према *E.coli* заснива се на интеркалацији флавоноида у ДНК што резултира инхибицијом ДНК гиразе, као и могућности ових једињења да се компетитивно вежу за ДНК и ометају функцију гиразе. (164). Поред инхибиције синтезе нуклеинских киселина, флавоноиди попут хлорогенске киселине као једне од квантитативно најзаступљенијих компонената наших екстраката, могу нарушити спољашњу и цитоплазматску мембрану бактерија (165). Спољашња мембрана грам-негативних бактерија се састоји од липополисахарида (ЛПС) и протеина који су стабилисани помоћу електростатичких интеракција са двовалентним катјонима. Анјонске супстанце попут хлорогенске киселине могу да хелирају јоне Mg^{2+} и на тај начин да наруше интегритет спољне мембране бактерија, која губи своју баријерну функцију. На тај начин се побољшава ефикасност антибиотика који не би успели да испоље своје деловање у случају ненарушене спољне мембране (165, 166). Такође таргет за бројне флавоноиде представља и плазма мембрана, тако што ова једињења повећавају њену пропустљивост. Нарушавањем спољашње и плазма мембране омета се размена нутријената и метаболита и инхибира енергетско снабдевање бактерија (165, 167). Генерално посматрано, интегритет бактеријске плазма мембрана је неопходан за регуларно одвијање осморегулације, респирације, биосинтезе липида итд, а нарушавање њене структуре води у смрт бактерије. Док неполарна једињења из групе флавоноида пролазе хидрофобни слој мембране, поларна формирају водоничне везе са поларним главама липида. Додатно, неспецифичне интеракције флавоноида са фосфолипидима могу изазвати структурне промене мембране и утицати на функцију мембранских протеина (168).

Још један од претпостављених механизма антибактеријске активности флавоноида је и инхибиција синтезе ћелијске мембране и агрегаторни ефекат на ћелијски зид бактерија. Такође предложено је да одређена фенолна једињења могу спречити настајање биофилма, тако што обложе површину ћелија, измене њену површину и последично ометају интеракцију између бактеријске ћелије и површине супстрата (169, 170). Велики значај полифенола огледа се и у синергистичком ефекту са бројним антибиотицима, који се базира на инхибицији ефлуксне пумпе која је задужена за избацивање антибиотика (171, 172). Такође поједина флавоноида једињења могу

инхибирати синтезу пептидогликана који је доминантно присутан у ћелијском зиду грам позитивних бактерија, инхибирати ензим β лактамазу и дихидрофолат редуктазу (173, 174).

Сматра се да екстракти са добром активношћу према одређеним грам-негативним бактеријама не морају нужно испољити високу ефикасност према осталим сојевима из групе грам-негативних бактерија. Такође постоје различити ланци истих бактеријских врста и то треба имати у виду приликом тумачења добијених резултата антимикробне активности екстраката (160).

5.4. Антиинфламациона активност екстраката ивањског цвећа

Будући да је примена синтетских антиинфламационих лекова повезана са појавом озбиљних нежељених ефеката, у фокусу истраживања последњих година налазе се природна једињења попут полифенола која могу изменити инфламациони одговор организма (175). Према нашим сазнањима нема података о улози ивањског цвећа у процесу инфламације, али имајући у виду њен хемијски састав, претпоставља се да би биоактивна једињења заједничким деловањем могла допринети смањењу запаљења. У циљу свеобухватног сагледавања терапијског потенцијала ивањског цвећа, један од наших циљева био је да испита утицај екстракта ове биљне врсте на развој едема шапе пацове на моделу карагенином изазване инфламације.

Наши резултати јасно указују на то све примењене дозе значајно смањују едем шапе пацова у односу на контролне услове, при чему су најбољи ефекти уочени након примене највеће дозе. Међутим ни највиша доза екстракта није успела да изазове степен инхибиције едема шапе који постиже референтни лек индометацин. Такође уочени ефекти екстракта су временски-зависни, указујући на то да је најмања инхибиција едема шапе у првим сатима, да би се након истека 4. сата испољила најизраженија редукција едема која је износили 25,71 %, 26,62% и 33,3% за дозе од 50, 100 и 200 mg/kg. Бројне студије сведоче о бифазном инфламационом одговору након примене карагенина. Наиме у иницијалној фази, односно у првом сату након инјекције карагенина, долази до ослобађања хистамина, серотонина и леукотриена и повећања васкуларне пропустљивости (176, 177). Још један значајан медијатор инфламације је NO који се на месту запаљења формира од стране бројних ћелија попут леукоцита, ендотелних ћелија и сензорних нервних ћелија. Сматра се да експресија COX-2

достиге максималну експресију 1 h након локалне апликације карагенина (178). Додатно, у наредној фази долази до инфилтрације неутрофила, продукције простагландина, брадикинина и развоја едема (176, 177). Ослобођени простагландини у садејству са хистамином и брадикинином доприносе развоју црвенила шапе и узрокују појачани проток на месту запаљења. Такође долази до ослобађања протеаза, лизозомалних ензима, миграције ћелија, активације и дегранулације (177, 179). Индометацин у нашем истраживању је испољио ефекте током друге фазе карагенином изазваног едема што је и очекивано обзиром да НСАИЛ инхибирају синтезу простагландина преко инхибиције COX (177). Примена нашег екстракта у средњој и највишој дози смањила је едем након 1. сата од апликације карагенина, док најнижа доза није имала ефекта у тој иницијалној фази запаљенског одговора. У сагласности са литературним подацима, пик едема постигнут је након 3 сата од инјекције карагенина у свим групама, што потврђује развој локалне и акутне инфламацијске реакције (180).

Обзиром на то да нема информација о антиинфламационој активности ивањског цвећа, уочени ефекти екстракта на нашем моделу се могу објаснити са аспекта хемијског састава и присуства једињења из групе полифенола. Бројне студије указују на антиинфламацијске ефекте полифенола које остварују посредством неколико механизма: инхибицијом ензима који су одговорни за настанак еикосаноида, инхибицијом ослобађања хисамина, фосфодиестеразе, протеин киназе и активацијом транскриптазе (181, 182).

У развоју инфламације велики је значај ензима попут циклооксигеназе (COX), липооксигеназе (5-LOX) и фосфолипазе A2 и они представљају потенцијалне таргете за деловање полифенола. Почетну основу у инфламационом одговору представља ослобађање арахидонске киселине од стране фосфолипазе A2, која се даље оксидује до бројних медијатора запаљења (простагландина, тромбоксана) под утицајем COX и 5-LOX. *In vitro* и *in vivo* тестовима показано је да полифеноли поседују способност да измене, односно инхибирају активност фосфолипазе A2 и COX и намећу се као могући кандидати у лечењу инфламаторних болести (182, 183).

Кверцетин и хлорогена киселина су квантитативно доминантни у нашем екстракту па се може претпоставити да значајно доприносе уоченим ефектима на испитиваном моделу. Ова једињења могу да измене метаболизам арахидонске киселине на различитим нивоима и последично умање продукцију еикосаноида. Док је за хлорогену киселину потврђено да је потентни инхибитор COX, за кверцетин се сматра да инхибира и COX и 5-LOX ензиме (184, 185). Документовано је да су флавоноиди

који испољавају антиагрегациону активност и потентни инхибитори COX и 5-LOX (182).

Поред набројаних механизма, флавоноиди могу и умањити ослобађање хистамина и на тај начин додатно допринети смањењу инфламационог одговора. Извештаји потврђују да хидроксиловани флавоноиди присутни у екстракту ивањског цвећа, као што су кемферол и кверцетин итд, могу спречити продукцију TNF- α , деловањем на нивоу транскрипције или посредством фосфодиестеразе (182). Претходно спроведена студија испитивала је ефекте хлорогене киселине на продукцију интерлеукина 8 (IL-8) изазвану TNF- α и H₂O₂ у епителним Сасо-2 ћелијама. Откривено је да ово једињење доводи до нискодне регулације продукције IL-8 (186). У сагласности са наведеном студијом, друга група истраживача потврдила је да хлорогена киселина умањује секрецију проинфламационих цитокина као што су IL-8 и IL-6 у Сасо-2 ћелијама стимулираним са тумор некрозис фактором α (TNF- α), липополисахаридом (ЛПС), IL-1 β и интерфероном γ (IFN- γ) (187). Наведени механизми могу донекле објаснити редукцију едема шапе пацова под утицајем ивањског цвећа у нашој студији.

Још један од потенцијалних начина којим флавоноиди остварују антиинфламациони ефекат подразумева утицај на протеинску тирозин киназу, протеин киназу Ц које су укључене у активацију ћелија током инфламације (182). Такође флавоноиди могу изменити инфламациони одговор инхибицијом активности ИкВ киназе (188). Додатно, откривено је да су кемферол и кемферол 3-*O*-*d*- глукосид, који су такође заступљени у екстракту ивањског цвећа, дозно-зависно инхибирани ЛПС и IFN- γ изазвану продукцију NO, TNF- α и IL-12 (189). Наведени механизми могу објаснити потенцијал екстракта ивањског цвећа да умањи едем шапе пацова на примењеном моделу инфламације изазване карагенином. Будући да флавоноиди имају способност да утичу на активност различитих медијатора запаљења, екстракти богати овом класом једињења попут ивањског цвећа истичу се као погодни агенси у третману инфламаторних стања. Обзиром на широку доступност ивањског цвећа, могуће је користити га или самостално или у комбинацији са осталим лековима у терапији различитих акутних и хроничних запаљенских стања.

Главни недостатак наведених података који се тичу молекулских механизма одговорних за ефекте флавоноида је што се морају испитати и потврдити на хуманој популацији. Такође иако је дозно-зависни ефекат флавоноида познат раније, и потврђен и у нашем истраживању, велики опрез треба постојати приликом повећања примењене дозе јер у високим дозама флавоноиди могу деловати као прооксиданси.

5.5. Ефекти екстраката ивањског цвећа на системски редокс статус

5.5.1. Ефекти екстраката ивањског цвећа на системски редокс статус здравих пацова

Велика пажња научне јавности усмерена је на измену редокс хомеостазе под утицајем лековитих биљака и биљних екстраката који су богати природним антиоксидансима (190). Стога један од наших циљева био је да испита да ли четворонедељни унос метанолног екстракта ивањског цвећа утиче на системски редокс статус, односно да ли може да повећа антиоксидациони капацитет здравих пацова.

Резултати овог истраживања указују на то да је примена екстраката ивањског цвећа довела до смањења концентрације мерених прооксиданаса, при чему је најизраженији ефекат уочен након примене дозе од 500 mg/kg. Када је реч о параметрима антиоксидационе заштите, третман екстрактом у највишој и средњој дози успео је да повећа активност SOD, док ни једна од примењених доза није утицала на CAT и GSH. Најзначајније дозно-зависне разлике у активности екстраката огледају се у знатно бољим антиоксидационим ефектима након конзумације 500 mg/kg у односу на 125 mg/kg.

Уочени ефекти екстраката ивањског цвећа на системски редокс статус се приписују присуству бројних једињења из групе полифенола. Наши резултати су показали да третман екстрактима доводи до пада у концентрацијама O_2^- и H_2O_2 , међутим динамика O_2^-/H_2O_2 не може се тумачити независно од активности ензима антиоксидационе одбране, као што су SOD и CAT. Повећана активност SOD под утицајем екстраката може бити одговорна за снижење нивоа O_2^- , обзиром да овај ензим катализује коверзију O_2^- у H_2O_2 (191). Стога се може претпоставити да је иницијална модулација SOD један од механизма којим ивањско цвеће испољава своје ефекте. Додатно, полифеноли могу инхибирати систем ксантин дехидрогеназа/ксантин оксидаза (ХО) што такође може допринети снижењу концентрације O_2^- и H_2O_2 и делимично објаснити добијене резултате (192). Поред свега наведеног, антиоксидациони потенцијал полифенола подразумева и њихову способност да делују као директни „хватачи“ слободних радикала (193, 194). Имајући у виду непромењене вредности CAT и GSH у свим групама пацова, може се претпоставити да је директна неутрализација слободних радикала, пре него активација антиоксидационог ензима

заштите, доминантни механизам који је одговоран за снижење нивоа слободних радикала под утицајем ивањског цвећа. Полифеноли делују као директни „хватачи“ слободних радикала донирањем водониковог атома или трансфером електрона (195). Додатно, литературни подаци сугеришу да флавоноиди могу спречити оксидацију јона метала, а захваљујући потенцијалу да хелирају јоне метала у траговима, попут Fe^{2+} and Cu^+ , могу значајно утицати на метаболизам кисеоника и настанак РОС (196). Истраживања која су испитивала антиоксидациони потенцијал ивањског цвећа користила су *in vitro* тестове, док података о утицају ове биљне врсте на системски редокс статус готово да нема (20, 41, 55). Према нашим сазнањима, једина студија у којој су одређивани параметри оксидационог стреса у крви пацова који су користили ивањско цвеће показала је способност екстракта да умањи липидну пероксидацију и повећа капацитет антиоксидационих ензима (56): Генерално гледано, обзиром на оскудан број података који се односе на антиоксидациону активност ивањског цвећа протективни ефекти наведеног ивањског цвећа се могу објаснити заједничким утицајем свих биоактивних једињења у екстракту. Кверцетин и његов гликозидно везани обик кверцетин-3-О- *Gl* се истичу по квантитативној заступљености у екстракту, а кверцетин је уједно и један од највише проучаваних полифенола. Његов антиоксидациони потенцијал је научно потврђен и везује се за присуство и положај –ОН субституената и катехолне групе у типу Б прстена у својој структури (196). Познато је да биоискористљивост и метаболизам полифенола ограничавају његову биолошку активност и зато је од великог значаја познавати понашање примењених полифенола у организму. Метаболизам кверцетина је највише испитиван и доказано је да његови метаболити поседују значајне антиоксидационе карактеристике (197, 198). Додатно, високе концентрације хлорогене и урсолне киселине у екстракту такође доприносе антиоксидационом деловању екстракта и могу обајаснити наше резултате. Бројне студије су потврдиле потенцијал ових једињења да спрече пероксидацију липидне мембране, што је у корелацији са нашим сазнањима. (184, 199). Иако су најблаготворнији ефекти ивањског цвећа уочени након примене највише дозе, приликом уноса полифенола треба бити обазрив јер јако велике дозе могу испољити и прооксидациону активност (200).

5.5.2. Ефекти екстракта ивањског цвећа на системски редокс статус спонтано-хипертензивних пацова

Све већи број научних доказа иде у прилог томе да оксидациони стрес има кључну улогу у патогенези хипертензије и погоршању хипертензивних срчаних поремећаја. Повећана продукција РОС, а нарочито O_2^- у стању хипертензије може разградити NO који је један од главних ендогених вазодилататора. На тај начин се смањује биоискористљивост NO, компромитује процес релаксације артерија и модификује ендотелна функција (64). Из тог разлога једна од посебних актуелности наше студије је испитивање утицаја примене екстракта ивањског цвећа на системски редокс статус хипертензивних пацова.

Наши резултати су показали да је четворонедељни унос екстракта у највишој и средњој дози довео је до снижења свих биомаркера системског оксидационог стреса, док је најнижа доза умањила системски ниво појединих прооксиданаса. Само највиша доза довела је до скока у активности SOD у односу на нетретиране животиње, док су активност CAT и ниво GSH остали непромењени под утицајем све три дозе екстракта. Генерално гледано екстракти ивањског цвећа су протективно утицали на редокс равнотежу пацова_што потврђују ниже концентрације системских прооксидационих маркера. Непромењене вредности антиоксидационих параметара указују на то да су уочене ниже концентрације прооксиданаса највероватније у највећој мери последица директне неутрализације слободних радикала под утицајем полифенола. С друге стране, повећање активности SOD након уноса екстракта у дози од 500 mg/kg иде у прилог томе да више концентрације полифенола могу побољшати антиоксидациони систем заштите хипертензивних пацова, док је овај утицај при нижим дозама занемарљив.

Природна биоактивна једињења из групе полифенола могу објаснити добијене резултате. Наиме полифеноли имају способност да инхибирају ензиме који производе РОС, као што су NADPH и XO, активирају и побољшавају експресију eNOS и повећају ниво GSH. На тај начин доприносе побољшању ендотелне функције, потпомажу нормализацију васкуларног тонуса и остварују антихипертензивни ефекат (201). Као што је и претходно наведено, велики допринос смањењу оксидационог стреса полифеноли остварују директним „хватањем“ слободних радикала.

Бројна истраживања сведоче о значају полифенола као антиоксиданаса у превенцији и терапији хипертензије. Мале измене у начину исхране које се односе на

повећан унос природних антиоксиданаса могу остварити значајне бенефите код хипертензивних пацијената (202). Предност употребе лековитих биљака попут ивањског цвећа као извора антиоксиданаса над синтетским лековима огледа се у: добром безбедоносном профилу, ограниченим нежељеним ефектима, доброј биорасположивости и ограниченом потенцијалу да изазову прооксидационе ефекте (64).

5.5.3. Разлике у ефектима екстракта ивањског цвећа на системски редокс статус код здравих и хипертензивних пацова

У циљу бољег разумевања терапијског потенцијала ивањског цвећа поредили смо и ефекте екстракта на редокс статус здравих и хипертензивних пацова. Наши резултати јасно указују да је и након третмана свим дозама екстракта ивањског цвећа, оксидациони стрес у условима хипертензије остао повишен. Раније је утврђено да је хипертензија повезана са израженијом пероксидацијом липида и повећаном продукцијом РОС као што су O_2^- и H_2O_2 , што је у сагласности са нашим резултатима (203). Примена екстракта ивањског цвећа је значајно умањила повишен оксидациони стрес који се јавља у хипертензији и тиме потенцијално ублажила оштећење артерија, али није успела да достигне вредности које су присутне код здравих пацова.

5.6. Ефекти екстракта ивањског цвећа на ex vivo исхемијско-реперфузиону повреду срца

Међу водећим узроцима смртности и инвалидитета налазе се исхемијски поремећаји који укључују инфаркт миокарда, мождани удар и периферну васкуларну болест. Стога још од када је пре скоро 6 деценија први пут описана И-Р повреда, пажња научне јавности је усмерена ка открићу новог третмана који може ублажити дисфункцију миокарда. Како би се приступило развоју нове терапијске стратегије од круцијалног значаја је разумевање свих патолошких догађаја током реперфузије. Оксидациони стрес и издражени инфламациони одговор, који се карактерише инфилтрацијом проинфламаторних неутрофила у исхемијско ткиво, остају један од критичних фактора који доприносе оштећењу миокарда (62). Стога могући таргети за

фармаколошко предкондиционирање могу бити ћелијски и ензимски извори стварања РОС, као и неколико инфламаторних медијатора. Примена полифенола или екстраката богатих полифенолима је у фази интензивног проучавања због антиоксидационих, антитромбогених, антиинфламацијских и антиапоптоличких својстава (204). Бројна истраживања су потврдила протективну улогу биљних екстраката у И-Р изазваном оштећењу срца управо захваљујући антиоксидационом и антиинфламацијском потенцијалу полифенола и флавоноида (велика група полифенола) (78). До сада нема података о ефектима ивањског цвећа на функцију срца и потенцијал ове биљне врсте да ублажи оштећење срца и умањи оксидациони стрес је отворен за дискусију. Претпоставили смо да четворонедељни третман екстрактом ивањског цвећа може да побољша функционалне и морфолошке карактеристике срца након исхемије. У циљу испитивања ефеката екстракта ивањског цвећа на И-Р повреду миокарда пратили смо параметре функције срца као и маркере оксидационог стреса у перфузату изолованог срца здравих и спонтано-хипертензивних пацова.

5.6.1. Утицај примене метанолног екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток пацова

5.6.1.1. Утицај примене метанолног екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток здравих пацова

Кардиодинамски параметри који су праћени у нашем истраживању односе се на функционалне карактеристике срца, посебно на леву комору и њену систолну и дијастолну функцију. На тај начин ефекти екстракта ивањског цвећа на измерене кардиодинамске варијабле одражавају његову потенцијалну терапијску улогу у моделу фармаколошког прекондиционирања.

Наши резултати јасно указују на то да су кардиодинамски параметри у контролним условима (CTRL група) значајно снижени током реперфузије у поређењу са вредностима пре исхемије. Уочена је депресија срчаног рада, као и ослабљене инотропне и лузитропне особине срца, које су евидентирани падом у апсолутним вредностима $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$ на крају тридесетоминутне реперфузије у односу на вредности у стабилизацији. Такође забележен је и пад у систолној функцији срца

(снижење SLVP вредности), фреквенци и коронарном протоку, потврђујући на тај начин да И-Р нарушава функцију миокарда.

Примена екстракта ивањског цвећа у свим дозама довела је до скока у вредности $dp/dt \max$ у првом минути реперфузије. Тај пораст код животиња које су користиле дозу екстракта од 500 mg/kg и 250 mg/kg је био реверзибилан и праћен је спорим континуираним падом током даље реперфузије, да би се по завршетку тридесетог минута вратио на вредности забележене пре исхемије. Једино у групи која је била на третману најнижом дозом екстракта вредности на крају реперфузије нису успеле да се приближе вредности у стабилизацији, већ су биле благо, али статистички значајно снижене. С друге стране уочени су протективни ефекти ивањског цвећа на стопу релаксације срца код примене све три дозе екстракта. Наиме средња и најнижа доза екстракта спречиле су флукуације у вредностима $dp/dt \min$ чиме су омогућиле срцу да се релаксира без промена у снази. Највиша доза ивањског цвећа није само очувала релаксациону моћ срца, већ је и побољшала, што се одразило скоком у апсолутној вредности $dp/dt \min$ по завршетку посматраног периода у односу на стабилизациони период. Све примењене дозе екстракта довеле су до повећања наведених параметара контрактилности на крају реперфузије у односу на нетретиране пацове.

Примена све три дозе екстракта је спречила пад у вредностима SLVP и DLVP услед И-Р, што указује на потенцијал екстракта да очува систолну и дијастолну функцију леве коморе. Значајно побољшан систолни капацитет уочен је код пацова третираних екстрактима у највишој и средњој дози по завршетку реперфузије у односу на животиње без третмана. Међутим иако се вредност SLVP на крају триседетоминутног периода у групи која је користила 125 mg/kg није значајно разликовала од контроле, протективни ефекти чак и ове најниже дозе се огледају у одржавању систоле релативно константом, без флукуација у условима И-Р. Наши резултати сугеришу да четворонедељна употреба екстракта у све три дозе значајно доприноси побољшању систолне функције миокарда након глобалне исхемије.

Обзиром на то да нема доступних података о ефектима ивањског цвећа на параметре контрактилности и релаксације, наши резултати се могу објаснити деловањем једињења која улазе у састав екстракта. У метанолном екстракту ивањског цвећа најзаступљенија једињења су хлорогена киселина, кверцетин, урсолна киселина, лутеолин-7-О- *Glc* и кверцетин-3-О- *Glc*. У литератури се као један од кључних патофизиолошких догађаја који учествују у прогресији И-Р повреде наводи преоптерећење Ca^{2+} као резултат преузимања Ca^{2+} из цитосола у сакроплазматски

ретикулум посредством Ca^{2+} -АТФ-азе (SERCA2a). Смањена експресија и активност SERCA2a, који су потврђени током И-Р изолованог срца пацова, додатно погоршавају Ca^{2+} overload и могу објаснити компромитовану систолну и дијастолну функцију срца нетретираних животиња. Повишен ниво Ca^{2+} у цитосолу доприноси отварању митохондријских транзиционих пора што води ка ћелијској смрти (205-207). С друге стране, сматра се да одређена флавоноидна једињења могу побољшати контрактилну снагу срца повећањем експресије SERCA2a, што утиче на повратак интрацелуларних Ca^{2+} резерви што обезбеђује довољно Ca^{2+} за наредну контракцију (207, 208). Наведени механизам модулације SERCA2a пумпе под утицајем полифенола може бити одговоран за побољшану контрактилност миокарда након уноса екстракта ивањског цвећа.

Група истраживача која је годинама проучавала ефекте лутеолина на кардиваскуларни систем указује да се његовом интрагастричном администрацијом спречава И-Р изазвано смањење активности SERCA2a. Овај ефекат лутеолин делимично остварује и преко активације PI3K/Akt сигналног пута, који је један од најзначајнијих сигналних механизма одговорних за регулисање ћелијског преживљавања. Показано је да лутеолин побољшава контрактилну снагу срца и превенирајући срчану фиброзу блокадом Ang II-TGF β 1 сигналног пута. Додатно на *in vitro* моделу је откривено да лутеолин доводи до бољег контрактилног одговора срца захваљујући активацији SERCA2a преко p38 MAPK сигналног пута (207, 209). Такође постоје подаци који сведоче о стимулацији SERCA под утицајем ниских концентрација кверцетина у дужем временском периоду (< 25 μM). Насупрот томе акутна примена овог флавоноида не утиче на оптерећење калцијумом (210). Генерално гледано улога флавоноида у хомеостази калцијума је од изузетног значаја имајући у виду да флукуације у концентрацији овог јона услед губитка способности срца да одржи физиолошки интрацелуларни ниво може узроковати аритмије и контрактилну дисфункцију (208).

Додатно, хлорогена киселина је присутна у највећој концентрацији у нашем метанолном екстракту ивањског цвећа ($15561 \pm 778 \mu\text{g/g}$ сувог екстракта). Претходно спроведена студија указује на то инфаркт миокарда доводи до тешке фиброзе са наглашеном инфилтрацијом макрофага. Међутим, орална примена хлорогене киселине у дози од 30 mg/kg током две недеље је ублажила фиброзне промене и супримира инфилтрацију макрофага, чиме је ефикасно спречила хронично васкуларно ремоделовање након инфаркта (211).

У циљу откривања дозно-зависног утицаја екстракта ивањског цвећа на *ex vivo* функцију срца извршено је поређење кардиодинамских параметара између група на третману 500 mg/kg, 250 mg/kg и 125 mg/kg екстракта. Највећи скок у параметрима $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$ детектован је у групи која је била изложена највишој дози у односу на остале дозе у првом минуту повратка протока у срце. Међутим током реперфузије вредности оба параметра су полако опадале, да би се на крају тридесетог минута приближиле вредностима забележеним у групи која је користила 250 mg/kg екстракта. На крају реперфузије вредности у групи која је била третирана најнижом дозом екстракта су биле значајно ниже у односу на друге две дозе, указујући на израженији протективни ефекат на контрактилна и релаксациона својства срца при вишим дозама екстракта. Бројни извештаји указују на то да је одговор срца на деловање флавоноида дозно-зависан. Показано је да кверцетин испољава позитивне инотропне и лузитропне ефекте при нижим концентрацијама (10^{-10} - 10^{-8} М), док при вишим (10^{-7} и 10^{-6} М) делује негативно инотропно и лузитропно (212). Такође протективни ефекти рутина на SERCA пумпу и последично на контрактилну моћ срца присутни су при нижим концентрацијама од 5–50 $\mu\text{mol/l}$, док је инхибиторни ефекат забележен при високим концентрацијама од 100–250 $\mu\text{mol/l}$ (213). Разлике у вредностима SLVP и DLVP између група на третману највишом и средњом дозом уочавају се у првим минутима реперфузије где је повећање вредности SLVP било резултат примене веће дозе екстракта. Међутим оно што је далеко важније су вредности на крају реперфузије, које одражавају касније последице И-Р повреде. У последњем минуту реперфузије, већи систолни и дијастолни капацитет срца постигнут је након примене највише у односу на најнижу дозу.

Када је реч о срчаној фреквенци, четворонедељни третман метанолним екстрактом ивањског цвећа у највишој дози узроковао је скок у вредности овог параметра у првом минуту реперфузије, али су се те вредности до краја реперфузије приближиле вредностима које су забележене у стабилизацији. Међутим, примена средње и најниже дозе није довела до варијација у вредностима срчане фреквенце током испитиваног периода, већ су се вредности одржале у константном опсегу. Непромењена срчана фреквенца омогућава срцу несметану контракцију и релаксацију, што још једном потврђује кардиопротективни потенцијал екстракта ове биљне врсте. Срчана фреквенца је била значајно виша у свим третираним у односу на нетретиране пацове након завршетка реперфузије. Претходно спроведено истраживање предлаже да

кверцетин остварује ефекте на срцу преко β -адренергичког пута, а повећање срчане фреквенце је вероватно ефекат на срчани пејсмејкер (210).

Примена екстракта у дози од 500 и 250 mg/kg одржала је вредности коронарног протока константним током читавог експеримента, што је показатељ очуваног одговора коронарне циркулације након излагања исхемији и реперфузији. С друге стране, примена најниже дозе довела је до пораста коронарног протока у првом минуту реперфузије, који је праћен даљим падом, да би до краја тридесетог минута поново достигао вредности које су биле присутне у стабилизационом периоду. Све три дозе екстракта утицале су на то да коронарни проток буде виши на крају реперфузије у односу на контролне услове.

Добијени резултати који се односе на коронарни протоок се могу објаснити утицајем флавоноида на L-аргинин/ NO систем. Бројни подаци указују на то да је очување биоактивности NO пореклом из ендотела један од главних механизма заслужних за кардиопротективне ефекте флавоноида (214). NO је један од најпотентнијих ендогених вазодилататора који се синтетише из L-аргинина каталитичким деловањем три изоформе NO синтазе: неуронске NOS (nNOS), индуцибилне NOS (iNOS и NOS II) и ендотелне NOS (eNOS и NOS III). Док су конститутивне NOS (nNOS и eNOS) задужене су за стварање и ослобађање малих кочичина NO које регулишу микроваскуларни тонус, индуцибилна iNOS се активира под утицајем имуностимулаторних цитокина, инфекција и бактеријских продуката и продукује велику количину NO (215, 216).

Активација iNOS у ендотелу доводи до продукције велике количине NO и везује се за патолошка стања попут исхемијско-реперфузионе повреде срца. Улога iNOS/ NO сигнализације у срчаној И-Р повреди је веома сложена и збуњујућа, а описани су и штетни и корисни ефекти iNOS. Сматра се да повећана експресија iNOS у стању сниженог оксидационог стреса преусмерава ефекте iNOS са негативних на протективне (216). Експериментално је потврђено да је током првих минута исхемије ниво eNOS повишен, да би се у условима дуготрајне исхемије смањивао (217). Вишеструки докази потврђују кардиопротективну улогу eNOS током И-Р повреде срца, а наглашавају да се у условима њене дефицијенције систолна и дијастолна функција срца погоршавају и може доћи и до смртног исхода (218). Повећање експресије eNOS током И-Р повреде може заштити срце преко повећања NO/ циклични гуанозин монофосфат (cGMP) (219). Очувани коронарни вазодилататорни одговор код пацова који су користили екстракт ивањског цвећа се може објаснити доказаним потенцијалом полифенола да активирају

eNOS и узрокују повећану синтезу и ослобађања NO, у условима смањене концентрације ROS. Насупрот томе, у присуству високе концентрације ROS, повећано стварање NO ће довести до настанка токсичног NOO- који погоршава срчану дисфункцију (214).

Једна од бројних предности полифенола који који су главне компоненте примењеног екстракта огледа се у њиховој задовољавајућој биоискористљивости и документованој корелацији између дневног уноса и плазма концентрације. Квантитативна заступљеност једињења у екстракту као и хемијска структура у многоме доприносе постигнутим ефектима. Наиме доступни подаци сугеришу да флавоноиди са 5-хидрокси и 5-метокси супституентом могу побољшати постисхемијски функционални опоравак срца. Насупрот томе, запажено је да деривати флавоноида који немају хидроксилну групу на позицији 5 немају тенденцију ка испољавању кардиопротективног деловања на моделу И-Р срца. Примењени екстракт у нашем истраживању садржи високу концентрацију кверцетина и кверцетин-3-О-Glc који поседују 5-хидрокси супституент, па се може претпоставити да они у многоме доприносе уоченим протективним ефектима ивањског цвећа (220).

5.6.1.2. Утицај примене метанолног екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток спонтано-хипертензивних пацова

Будући да присуство хроничне хипертензије погоршава исход И-Р повреде, актуелност овог истраживања базира се и на испитивању утицаја екстракта ивањског цвећа на моделу спонтано-хипертензивних пацова (221). Бројне експерименталне студије су показале нижу ефикасност одређених маневара прекондиционирања срца у условима хипертензије (222, 223). Имајући у виду претходно наведено, као и да је осетљивост хипертензивног срца на И-Р и даље недовољно истражена, један од наших циљева је био да испита ефикасност екстракта ивањског цвећа код кардиодинамске параметре и коронарни проток хипертензивних пацова.

Наши резултати су показали да двадесетоминутна исхемија праћена тридесетоминутном реперфузијом на срцу спонтано-хипертензивних животиња нарушава контрактилну снагу срца, систолну функцију, као и одговор коронарне циркулације. Ове промене манифестоване су падом у вредностима свих испитиваних параметара сем DLVP на крају реперфузије у односу стабилизациони период. Добијени

результати у складу су са претходно потврђеним штетним последицама И-Р повреде. Наиме системска хипертензија је повезана са активацијом неурохуморалних механизма који продубљују оштећења миокарда након исхемије (224).

Примена екстракта ивањског цвећа у највишој дози није довела до осцилација у вредностима испитиваних параметера, указујући на потпуно очувани рад срца изложеног исхемији и реперфузији. С друге стране, након третмана екстрактом у средњој и нижој дози дошло је до реверзибилних промена поједених кардиодинамских параметера детектованих у првом минути реперфузије. Међутим по завршетку тридесетоминутне реперфузије сви параметри су се вратили на вредности пре исхемије, што је индикатор ненарушеног срчаног рада. Бенефити третмана екстрактом ивањског цвећа у дози од 500 mg/kg огледају се и у повећању вредности свих испитиваних параметера, изузев дијастолног притиска, на крају реперфузије у односу на нетретирани хипертензивне пацове. Такође излагање дози од 250 mg/kg праћено је вишим вредностима $dp/dt \max$, $dp/dt \min$, HR и CF на крају реперфузије, а најнижој дози скоком у $dp/dt \min$, DLVP и HR у односу на животиње које нису користиле екстракт..

Наведени резултати указују на то да су све три дозе екстракта допринеле опоравку функције срца спонтано-хипертензивних животиња. Међутим највиша и средња доза имале су бољи утицај на контрактилну и релаксациону моћ срца у односу на најнижу дозу. Скок у систолном и дијастолном капацитету као и коронарном протоку се истиче у групи која је била на третману највишом дозом у односу на остале две дозе. Ови резултати још једном потврђују бољи ефекат екстракта ивањског цвећа на функционални опоравак срца у вишој дози.

Познато је да хипертрофија леве коморе може настати као одговор срца на повећано оптерећење притиском, а праћена је повећањем дебљине зида и мањим повећањем дијаметра леве коморе. Када се то оптерећење притиском одржава, хипертрофија може да напредује до вентрикуларне дилатације и контрактилне дисфункције (225). Сматра се да су механизми флавоноида који се заснивају на повећаној активности SERCA пумпе описани претходно одговорни за побољшану контрактилну функцију срца како код нормотензивних тако и код хипертензивних животиња. Додатно, очуваност коронарног протока се може приписати ендотел-зависним релаксирајућим ефектима полифенола који су посредовани NO. У стању хипертензије смањена доступност NO утиче на настанак ендотелне дисфункције и доводи до измена у вредностима крвног притиска, а ендотелна дисфункција води у атеросклеротску коронарну и церебралну артеријску болест. Стога је разумевање

молекуласких механизма који регулишу сигнализацију NO у патофизиолошким условима од пресудног значаја на путу ка открићу нових терапијских стратегија. Неколико механизма може објаснити смањење NO у присуству хипертензије, али се издваја деструкција овог гасног трансмитера под деловањем O_2^- (226). Будући да флавоноиди повећавају експресију eNOS и последично повећавају ниво NO, јасно се уочава недвосмислен значај ових природних једињења у хипертензивним условима, а нарочито након исхемије. Још један од механизма одговорних за вазорелаксацију је и ефекат флавоноида на стимулацију продукције простациклина (227). Наши резултати су у корелацији са претходно спроведеним истраживањима који предлажу протективну улогу флавоноида у превенцији погоршања васкуларне ендотелне функције у хипертензивним условима (228). Утицај хемијске структуре, односно предност 5-хидрокси и 5-метокси супституисаних флавоноида над осталим флавоноидима истиче се и када је реч о ефектима екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре хипертензивних пацова. Највероватнији су благотворни ефекти екстракта последица синергистичког и адитивног деловања компоненти присутних у највећим концентрацијама, а нарочито 5-хидрокси супституисаних једињења (220).

5.6.1.3. Разлике у ефектима екстракта ивањског цвећа на кардиодинамске параметре и коронарни проток код здравих и спонтано-хипертензивних пацова

Значајно ниже вредности $dp/dt \max$, SLVP и DLVP код SHR животиња у одсуству третмана указују на лошији контрактилни одговор и систолну и дијастолну функцију хипертензивног срца. Такође срчана фреквенца је била значајно нижа, потврђујући да је присуство хипертензије повезано са већим оштећењем срца након И-Р. Више вредности односа масе срца и телесне масе код хипертензивних пацова указују на то да је системска хипертензија повезана са развојем вентрикуларне хипертрофије. И након третмана екстрактом ивањског цвећа у свим дозама контрактилна снага срца, систолни капацитет и срчана фреквенца хипертензивних пацова били су нижи. С друге стране примена највише дозе екстракта била је повезана са значајно вишим коронарним протоком код здравих животиња, док су остале две дозе узроковале сличан одговор коронарне циркулације код здравих и хипертензивних животиња. Средња доза екстракта је у обе испитиване групе резултирала сличним дијастолним капацитетом

срца, док је након примене највише и средње дозе уочена већа вредност DLVP код хипертензивних пацова. Међутим повећање овог параметра није компромитовало систолну функцију. Однос масе срца и телесне масе у свим групама хипертензивних пацова је остао виши у односу на здраве. Генерално гледано, средња доза екстракта је највише успела да функцију хипертензивних срца приближи здравим, али је несумњиво бољи ефекат на укупни опоравак здравих и хипертензивних срца под утицајем највише дозе. Ови резултати су сагласности са преходним извештајима да патофизиолошке промене које прате стање повишеног крвног притиска доводе до веће осетљивости срца на И-Р повреду и последично већег степена оштећења (229).

5.6.2. Утицај примене метанолног екстракта ивањског цвећа на срчани редокс статус

Почетком 1980-их година РОС су предложене као потенцијални медијатори реперфузионе повреде и наведена претпоставка је врло брзо прихваћена и постала предмет интересовања научника. Наиме реперфузија исхемијског ткива узрокује екцесивну продукцију слободних радикала који учествују у нарушавању функционалних и морфолошких карактеристика миокарда (119). Претпоставили смо да примена ивањског цвећа може умањити оксидациони стрес у И-Р и побољшати опоравак срца.

5.6.2.1. Ефекти екстракта ивањског цвећа на срчане маркере оксидационог стреса здравих пацова

У складу са преходним извештајима, И / Р у нашој студији је довела до пораста концентрација свих срчаних прооксиданаса на крају реперфузије у односу на вредности пре исхемије. Наиме повратак протока у исхемијско ткиво доводи до настанка дисбаланса између брзине стварања прооксиданата и способности миокарда да их детоксикује. Сматра се да су главни извори прооксиданаса у реперфузији: митохондријални респираторни транспортни ланац електрона, активација ксантин оксидазе (ХО) у ендотелним и NADPH оксидазе (NOX) у инфламацијским ћелијама.

Патолошка улога NOX ензима верификована је на бројним моделима И-Р повреде. Сматра се да повећана активност NOX резултира повећаном продукцијом реактивних врста попут O_2^- и H_2O_2 што може делимично да објасни високе концентрације ове РОС уочене у нашем истраживању. Додатно, ослобађање O_2^- доводи до регрутовања и активације неутрофила и њиховог адхерирања за ендотелне ћелије што стимулише настанак XO и додатну продукцију O_2^- (230). Такође важну улогу у настанку И-Р оштећења се приписују и нитрозативном стресу и RNS. Док NO самостално не узрокује штетне ефекте, у реакцији са прекомерно продукованим O_2^- доводи до настанка пероксинитрита што објашњава нитросативно оштећење срца (231).

Третман екстрактом ивањског цвећа у највишој дози није само спречио повећање маркера оксидационог оштећења, већ је довео и до смањења концентрације O_2^- и H_2O_2 на крају реперфузије у односу на период пре исхемије. С друге стране, средња и најнижа доза екстракта биле су довољне да спрече пораст концентрације већине прооксиданаса, изузев TBARS-а у групи 250 GVE и O_2^- у 125 GVE који су остали повишен на крају реперфузије. Док је први минут реперфузије праћен скоком у концентрацији NO_2^- у свим групама, у даљем току реперфузије вредности су полако опадале да би се након 30 минута вратиле на вредности пре исхемије. Након примене највише и средње дозе екстракта концентрација већине прооксидантних маркера је била значајно нижа у односу на контролне услове, док је у случају најниже дозе та разлика минимално изражена.

Вредности срчаних маркера оксидационог стреса су у сагласности са системским параматерима, наглашавајући способност ивањског цвећа да измени редокс сигнализацију и умањи оксидациона оштећења. Одсуство скока у вредности TBARS одражава способност екстракта ивањског цвећа да очува интегритет липидне мембране. Наша открића су у корелацији са резултатима бројних студија који потврђују бенефите екстракта богатих полифенолима у умањењу И-Р-изазваног оксидационог стреса (120). Обзиром да улога ове биљне врсте у И-Р повреди остаје непознаница, наши резултати се могу објаснити са аспекта хемијског састава екстракта. Сматра се да су полифеноли из екстракта помогли срчаном ткиву да одржи баланс у нивоу већине прооксиданаса што је у многоме допринело кардиопротекцији. Механизам који лежи у основи антиоксидационе активности полифенола, а самим тим највероватније и нашег екстракта, је претежно директна неутрализација слободних радикала (150). Екстракт ивањског цвећа је смањењем концентрације H_2O_2 или превенцијом скока овог прооксиданса у срчаном ткиву омогућио очување васкуларног тонууса (232). Додатно

патолошке промене у срчаној редокс сигнализацији могу довести до контрактилне и енергетске дисфункције, појаве аритмија, промена у процесу транскрипције, ослобађању митохондријских слободних радикала и у крајњем до поремећаја у хомеостазу калцијума (233). У стању оксидационог стреса срце покушава да развије адаптивни одговор како би очувало контрактилност, али уколико компензаторни механизми нису довољни може доћи до смрти ћелија (234). Из тих разлога умањење и/или превенција оксидационог оштећења под утицајем ивањског цвећа је од изузетног значаја за одржавање срчаног рада и очување контрактилне функције, што је и потврђено резултатима кардиодинамике у нашој студији.

5.6.2.2. Ефекти екстракта ивањског цвећа на маркере оксидационог стреса спонтано-хипертензивних пацова

Повећан оксидациони стрес је детектован на различитим моделима спонтане и експерименталне хипертензије (235). Додатно, изражена осетљивост хипертензивног срца на И-Р повреду намеће потребу за испитивањем потенцијала природних антиоксиданаса да модулирају редокс сигнализацију чиме би се постигла кардиопротекција (235, 236). Наши резултати указују на то да је И-Р довела до скока у концентрацији свих испитиваних проксидационих маркера спонтано-хипертензивних животиња, што додатно потврђује да је оксидациони стрес укључен у настанак И-Р повреде. Међутим четворонедељна примена екстракта у дози од 500 mg/kg не само да је спречила И-Р изазвано повећање концентрације прооксиданаса, већ је умањила концентрацију O_2^- и H_2O_2 на крају реперфузије. Додатно третман дозом од 250 mg/kg одржао је вредности TBARS и H_2O_2 током реперфузије, док се само код пацова који су примали најнижу дозу екстракта бележе више вредности свих маркера оксидационог стреса на крају реперфузије у односу на стабилизациони период. Непромењене вредности TBARS указују на очуван интегритет липидне мембране (237). Генерално гледано, снижење маркера оксидационог стреса доприноси очувању контрактилности срца и спречава појаву аритмија и дисфункције срца (238, 239). Такође смањењем нивоа O_2^- изостаје његова интеракција са NO и настајање токсичног $ONOO^-$. Повећање биоискористљивости NO под утицајем примене флавоноида је од великог значаја у третману И-Р повреде срца хипертензивних животиња (238, 214). Додатно, умањењем нивоа ROS након третмана екстрактом ивањског цвећа вероватно се смањује инвазија

моноцита, инфламација и хипертензивно васкуларно оштећење (239). Такође можемо претпоставити и да супримирање активности XO и NOX услед примене полифенола значајно снижава продукцију РОСа у ендотелним ћелијама и кардиомиоцитима, што доприноси опоравку срца након И-Р (240, 241).

Поређењем концентрација прооксиданаса по завршетку реперфузије у третираним групама у односу на нетретирану, јасно се уочава ефикасност све три дозе екстракта у смањењу оксидационих оштећења. Међутим примена екстракта у дози од 500 mg/kg довела је до значајног пада концентрација већине прооксидантних маркера у односу на преостале две дозе на крају тридесетоминутне реперфузије. Такође највиша доза била је праћена најизраженијим скоком у NO_2^- на самом почетку реперфузије, који је праћен смањењем током реперфузионог периода. Док је скок у ослобађању слободних радикала на почетку реперфузије срца већ потврђен, подаци о променама које се одвијају у даљем току реперфузије остају контроверзни (242). Додатно, средња доза ивањског цвећа је значајно снизила поједине маркере у односу на најнижу дозу, потврђујући још једном да је ефекат ивањског цвећа дозно-завистан. Највиши потенцијал највеће дозе да ублажи И-Р изазван оксидациони стрес иде у прилог томе да веће концентрације полифенола могу остварити израженији ефекат, али не сме се заборавити да прекомерно повећање дозе може у одређеним условима деловати прооксидантно.

5.6.2.3. Разлике у ефектима екстракта ивањског цвећа на маркере оксидационог стреса код здравих и спонтано-хипертензивних пацова

У циљу добијања комплетних информација о ефектима ивањског цвећа у присуству и одсуству повишеног крвног притиска, поредили смо здраве и хипертензивне пацове који су били на третману истом дозом екстракта. У групи нетретираних хипертензивних пацова уочена је израженија иницијална продукција прооксиданаса која је евидентирана вишим вредностима H_2O_2 и O_2^- у првом минуту реперфузије у односу на здраве. Такође на крају реперфузије у условима хипертензије детектован је виши ниво липидне пероксидације, као и виша концентрација H_2O_2 што указује на већи степен оштећења у односу на пацове са нормотензијом. С друге стране, додатак највише и најниже дозе екстракта код хипертензивних пацова није успео да приближи срчани редокс статус условима који постоје код здравих пацова, већ су се

одржале више вредности већине прооксидационих параметара на крају реперфузионог периода. Такође сличне концентрације већине прооксиданаса су уочене између група које су третиране средњом дозом екстракта, изузев повишеног индекса липидне пероксидације који је био присутан код хипертензивних пацова. Ови резултати су у сагласности са резултатима који се односе на системски оксидациони стрес, потврђујући још једном виши степен оксидационог оштећења у условима хипертензије, било да је нетретирана или третирана екстрактом ивањског цвећа.

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата овог истраживања могу се извести следећи закључци:

- HPLC-DAD анализа указује на присуство бројних биоактивних једињења у метанолном, ацетонском и воденом екстракту *G. verum*, међу којима се по највећој заступљености издвајају хлорогена киселина, цинарозид, изокверцетин и урсолна киселина. Иако је квалитативни састав сва три типа екстракта доста сличан, концентрација биомолекула варира је у зависности од поларности примењеног растварача.
- Примена воде као растварача за екстракцију *G. verum* била је повезана са највећим садржајем фенолних једињења у екстракту, док је најнижи садржај откривен код метанолног екстракта.
- Највећи садржај флавоноидних једињења и највећи капацитет неутрализације DPPH радикала био карактеристичан за метанолни екстракт, док је најнижи био присутан код ацетонског.
- Метанолни, ацетонски и водени екстракти *G. verum* испољили су умерену антибактеријску и антибиофилм и генерално слабу антигљивичну активност, чији је интензитет зависио од врсте микроорганизма и типа екстракта.
- Све три дозе метанолног екстракта *G. verum* показале су потенцијал да ублаже инфламациону реакцију изазване карагенином, при чему је израженији ефекат уочен након администрације више дозе.
- Екстракти ове биљне врсте у свим дозама утицали су на системску редокс хомеостазу у смислу умањења нивоа прооксидационих молекула, док је само највиша доза довела до повећања капацитета антиоксидационог система заштите.
- Унос метанолног екстракта *G. verum* у свим испитиваним дозама остварио је протективне ефекте на исхемијско-реперфузиону повреду миокарда, што указује на могућу примену ове биљне врсте у маневру прекондиционирања срца.
- Четворонедељни унос екстракта *G. verum* допринео је очувању контрактилне и релаксационе снаге срца и спречио коронарну васкуларну дисфункцију изазвану исхемијом и код здравих и код спонтано-хипертензивних пацова.
- Третамаман екстрактом *G. verum* у свим дозама довео је до смањења срчане продукције прооксиданаса и у условима нормотензије и хипертензије, чиме је значајно ублажио оксидациона оштећења подстакнута исхемијом-реперфузијом.

- Снижење нивоа прооксидационих молекула под утицајем ивањског цвећа указује на то да су остварени кардипротективни ефекти барем делимично посредовани антиоксидационим својствима ове биљне врсте.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. M. Gajić. Flora of Serbia. Belgrade: Serbian Academy of Sciences and Arts; 1973.
2. Lakić N, Mimica-Dukić N, Isak J, et al. Antioxidant properties of Galium verum L. (Rubiaceae) extracts. Cent Eur J Biol. 2010;5:331-7.
3. Bradic J, Petkovic A, Tomovic M. Phytochemical and Pharmacological Properties of Some Species of the Genus Galium L. Galium Verum and Mollugo. Serbian Journal of Experimental and Clinical Research. 2018, doi: 10.1515/sjecr-2017-0057
4. Feijoo-Siota L, Rama JLR, Sánchez-Pérez A, Villa TG. Expression, activation and processing of a novel plant milk-clotting aspartic protease in Pichia pastoris. J Biotechnol. 2018;268:28-39.
5. Schmidt M, Scholz CJ, Gavril GL, et al. Effect of Galium verum aqueous extract on growth, motility and gene expression in drug-sensitive and-resistant laryngeal carcinoma cell lines. International journal of oncology. 2014;44(3):745-60.
6. Al-Snafi AE. Galium verum-A review. Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences. 2018;5(4):2142-9.
7. Mitova MI, Anchev ME, Handjieva NV, et al. Iridoid patterns in Galium L. and some phylogenetic considerations. Zeitschrift für Naturforschung C. 2002;57(3-4):226-34.
8. Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. Biotechnology advances. 2015;33(8):1582-614.
9. Sofowora A, Ogunbodede E, Onayade A. The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines. 2013;10(5):210-29.
10. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. Nutrients. 2010;2(12):1231-46.
11. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxidative medicine and cellular longevity. 2009;2(5):270-8.
12. Scalbert A, Manach C, Morand C, et al. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Critical reviews in food science and nutrition. 2005;45(4):287-306.
13. Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. Annual review of nutrition. 2002;22(1):19-34.
14. Oliveira LD, Carvalho MV, Melo L. Health promoting and sensory properties of phenolic compounds in food. Revista Ceres. 2014;61:764-79.

15. Beckman CH. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2000;57:101–10.
16. Zhao CC, Shao JH, Li X et al. Flavonoids from *Galium verum* L. *J Asian Nat Prod Res.* 2008;10(7-8):613-7.
17. Zhao C, Shao J, Cao D, et al. [Chemical constituents of *Galium verum*]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2009; 34(21):2761-4.
18. Matei AO, Gatea F, Radu GL. Analysis of Phenolic Compounds in Some Medicinal Herbs by LC-MS. *J Chromatogr Sci.* 2015;53(7):1147-54.
19. Mocan A, Crisan G, Vlase L, et al. Phytochemical investigations on four *Galium* species (Rubiaceae) from Romania. *Farmacina.* 2016;64(1):95-9.
20. Vlase L, Mocan A, Hanganu D, et al. Comparative study of polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of four *Galium* species (Rubiaceae). *Digest journal of nanomaterials and biostructures.* 2014;9(3):1085-94.
21. Tămaş M., Stana D., Timiş S., Comparative phytochemical research of *Galium verum* L. and *G. mollugo* L. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj,* 2006;34:18-20.
22. Hu ML. Dietary polyphenols as antioxidants and anticancer agents: more questions than answers. *Chang Gung Med J.* 2011;34(5):449-60.
23. Graf BA, Milbury PE, Blumberg JB. Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. *Journal of medicinal food.* 2005;8(3):281-90.
24. Arts IC, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American journal of clinical nutrition.* 2005 Jan 1;81(1):317S-25S.
25. Dent M, Dragovic-Uzelac V, Penic M, et al. The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food technology and biotechnology.* 2013;51(1):84.
26. Milić PS, Stanojević LP, Rajković KM, et al. Antioxidant activity of *Galium mollugo* L. extracts obtained by different recovery techniques. *Hemijska industrija.* 2013;67(1):89-94.
27. Ngo TV, Scarlett CJ, Bowyer MC, et al. Impact of different extraction solvents on bioactive compounds and antioxidant capacity from the root of *Salacia chinensis* L. *Journal of Food Quality.* 2017;2017.

28. Turkmen N, Velioglu Y, Sari F, et al. Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*. 2007;12(3):484-96.
29. Rajbhar KA, Dawda HI, Mukundan US. Polyphenols: methods of extraction. *Scientific reviews and chemical communications*. 2015;5(1):1-6.
30. Tundis R, Loizzo MR, Menichini F, et al F. Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2008;8(4):399-420.
31. Viljoen A, Mncwangi N, Vermaak I. Anti-inflammatory iridoids of botanical origin. *Current medicinal chemistry*. 2012;19(14):2104-27.
32. Bőjthe-Horváth K., Hetényi F., Kocsis Á et al. Iridoid glycosides from *Galium verum*. *Phytochemistry*, 1980;21:2917-19.
33. Bőjthe-Horváth K, Kocsis Á, Párkány L, et al. A new iridoid glycoside from *Galium verum* L. First X-ray analysis of a tricyclic iridoid glycoside. *Tetrahedron Letters*. 1982;23(9):965-6.
34. Demirezer LO, Gurbuz F, Guvenalp Z et al. Iridoids, flavonoids and monoterpene glycosides from *Galium verum* subsp. *verum*. *Turk J Chem*. 2006;30:525-34.
35. Lee TG, Kim DK. Iridoid Compounds from the Whole Plant of *Galium verum* var. *asiaticum*. *Natural Product Sciences*. 2013;19(3):227-30.
36. Wink M. Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. *Medicines*. 2015;2(3):251-86.
37. Zhao CC, Shao JH, Li X et al. A new anthraquinone from *Galium verum* L. *Nat Prod Res*. 2006;20:981-4.
38. Ogbe RJ, Ochalefu DO, Mafulul SG, et al. A review on dietary phytosterols: Their occurrence, metabolism and health benefits. *Asian J. Plant Sci. Res*. 2015;5(4):10-21.
39. Il'ina TV, Kovaleva AM, Goryachaya OV, et al. Essential oil from *Galium verum* flowers. *Chemistry of natural compounds*. 2009;45(4):587-8. Mirzam M, Navaei MN, Dini M. Essential oil of *Galium verum* L. from Iran. *Iran J Pharm Res*. 2004;3:88.
40. Mirzam M, Navaei MN, Dini M. Essential oil of *Galium verum* L. from Iran. *Iran J Pharm Res*. 2004; 3: 88-88.
41. Mitic VD, Stankov-Jovanovic VP, Ilic MD et al. The antioxidant, hemolytic and cholinesterase inhibition properties of *Galium verum* L. and *Tragopogon pratensis* subsp *pratensis*. *Bulg Chem Commun*. 2014;46:269-76.

42. Jaric S, Popović Z, Macukanović-Jocic M et al. An ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Serbia). *J Ethnopharmacol.* 2007;20:160-75.
43. Roman I, Toma VA, Farcas AD. Protective effects of *Galium verum* L. extract on the hypothalamic--pituitary--adrenal axis under anakinetic stress conditions, in rats. histological aspects. *Studia Universitatis Vasile Goldis Seria Stiintele Vietii (Life Sciences Series).* 2015;25:207-14
44. Menkovic N, Savikin K, Tasic S et al. Ethnobotanical study on traditional uses of wild medicinal plants in Prokletije Mountains (Montenegro). *J Ethnopharmacol.* 2011;133:97–107.
45. Popovic Z, Smiljanic M, Kostic M et al. Wild flora and its usage in traditional phytotherapy (Deliblato Sands, Serbia, South East Europe). *Indian J Tradit Know.* 2014;13:9-35
46. Kavvadias D, Sand P, Youdim KA, et al. The flavone hispidulin, a benzodiazepine receptor ligand with positive allosteric properties, traverses the blood–brain barrier and exhibits anticonvulsive effects. *British journal of pharmacology.* 2004;142(5):811-20.
47. Al-Douri NA. A survey of medicinal plants and their traditional uses in Iraq. *Pharm Biol.* 2000;38:74-9.
48. Bolivar P, Cruz-Paredes C, Hernandez LR et al. Antimicrobial, anti-inflammatory, antiparasitic, and cytotoxic activities of *Galium mexicanum*. *J Ethnopharmacol.* 2011;137:141-7
49. Hartwell JL. Plants used against cancer. A survey. *Lloydia.* 1971;34:204-55.
50. Zhao R, Chen Z, Jia G et al. Protective effects of diosmetin extracted from *Galium verum* L. on the thymus of U14-bearing mice. *Can J Physiol Pharmacol.* 2011;89:665-73.
51. Roman I, Puica C. Effects of Anakinetic Stress and *Galium verum* Extract on the Thyroid and Ovary Morphology in Wistar Rats. *Bulletin UASVM.* 2013;70:167-9.
52. Vasilevna IT, Volodymyrivna GO, Leonidivna TE et al. Antimicrobial Activity of the Genus *Galium* L. *Pharmacogn. Commn.* 2016;6:42-7.
53. Ergun F, Deliorman D, Veliog IA et al. Antimicrobial activities of *Galium* species. *J Fac Pharm Gazi.* 1999;16:7–11
54. Yigit D, Yigit N, Ozgen U. An investigation on the anticandidal activity of some traditional medicinal plants in Turkey. *Mycoses.* 2009; 52:135-40

55. Layali I, Ebrahimzadeh MA, Joulaei M. Antioxidant properties of *Galium verum*. Int. J. Life Sci. Pharma Rres.. 2016;6:31-7.
56. Farcas AD, Mot AC, Zagrean-Tuza C, et al. Chemo-mapping and biochemical-modulatory and antioxidant/prooxidant effect of *Galium verum* extract during acute restraint and dark stress in female rats. PloS one. 2018;13(7):e0200022.
57. Mavi A, Terzi Z, Özgen U, et al. Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum* subsp. *verum* (Rubiaceae), *urtica dioica* (urticaceae). Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2004;27(5):702-5.
58. Danila AO, Gatea F, Radu GL. Polyphenol composition and antioxidant activity of selected medicinal herbs. Chem Nat Compd. 2011;47(1): 22-6.
59. Xia Z, Li H, Irwin MG. Myocardial ischaemia reperfusion injury: the challenge of translating ischaemic and anaesthetic protection from animal models to humans. Br J Anaesth. 2016;117:ii44-ii62.
60. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, et al. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. Int Rev Cell Mol Biol. 2012;298:229-317.
61. Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2011;301(5):H1723-41.
62. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, et al. Ischemia/Reperfusion. Compr Physiol. 2016; 7:113-170.
63. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, et al. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. Arch Pathol. 1960;70:68-78.
64. Baradaran A, Nasri H, Rafieian-Kopaei M. Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences. 2014;19(4):358.
65. Tulman DB, Stawicki SP, Papadimos TJ, et al. Advances in management of acute hypertension: a concise review. Discovery medicine. 2012;13(72):375.
66. Broadley KJ, Penson PE. The roles of alpha- and beta-adrenoceptor stimulation in myocardial ischaemia. Autonomic and Autacoid Pharmacology. 2004;24(4):87-93.

67. Jones SP, Bolli R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2006;40(1):16-23.
68. Mozaffari MS, Liu JY, Abebe W, et al. Mechanisms of load dependency of myocardial ischemia reperfusion injury. *American journal of cardiovascular disease*. 2013;3(4):180.
69. de Vries DK, Kortekaas KA, Tsikas D, et al. Oxidative damage in clinical ischemia/reperfusion injury: a reappraisal. *Antioxidants & redox signaling*. 2013;19(6):535-45.
70. Zweier JL, Talukder MH. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovascular research*. 2006;70(2):181-90.
71. Slegtenhorst BR, Dor FJ, Rodriguez H, et al. Ischemia/reperfusion injury and its consequences on immunity and inflammation. *Current transplantation reports*. 2014;1(3):147-54.
72. Morin D, Musman J, Pons S, et al. Mitochondrial translocator protein (TSPO): From physiology to cardioprotection. *Biochem Pharmacol*. 2016;105:1-13.
73. Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochemical Journal*. 1995;307(1):93-8.
74. Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovascular research*. 2004;61(3):481-97.
75. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74(5):1124-36.
76. Li W, Wu N, Shu W, et al. Pharmacological preconditioning and postconditioning with nicorandil attenuates ischemia/reperfusion-induced myocardial necrosis and apoptosis in hypercholesterolemic rats. *Experimental and therapeutic medicine*. 2015;10(6):2197-205.
77. Mohanty IR, Gupta SK, Arya DS, et al. Medicinal herbs can play significant role in attenuation of ischemia and reperfusion injury. *Journal of Homeopathy and Ayurvedic Medicine*. 2013;3:2-5.
78. Akhlaghi M, Bandy B. Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia–reperfusion injury. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2009;46(3):309-17.

79. Barteková M, Čarnická S, Pancza D, et al. Acute treatment with polyphenol quercetin improves postischemic recovery of isolated perfused rat hearts after global ischemia. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2010;88(4):465-71.
80. Testai L, Martelli A, Cristofaro M, et al. Cardioprotective effects of different flavonoids against myocardial ischaemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2013;65(5):750-6.
81. Debnath J, Nath LK. A review on pathophysiology of ischemic-reperfusion injury of heart and ameliorating role of flavonoids and polyphenols. *Journal of medicinal plants research*. 2014;8(16):607-14.
82. Wang Y, Zhang ZZ, Wu Y, et al. Quercetin postconditioning attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats through the PI3K/Akt pathway. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2013;46(10):861-7.
83. Agrawal YO, Sharma PK, Shrivastava B, et al. Hesperidin produces cardioprotective activity via PPAR- γ pathway in ischemic heart disease model in diabetic rats. *PLoS One*. 2014;9(11):e111212.
84. Li W, Li Y, Sun R, et al. Dual character of flavonoids in attenuating and aggravating ischemia-reperfusion-induced myocardial injury. *Experimental and therapeutic medicine*. 2017;14(2):1307-14.
85. Mahmoudabady M, Lashkari M, Niazmand S, et al. Cardioprotective effects of *Achillea wilhelmsii* on the isolated rat heart in ischemia–reperfusion. *Journal of traditional and complementary medicine*. 2017;7(4):501-7.
86. Garjani A, Vaez H, Delazar A, Rameshrad M, Heshmati Afshar F, Asgharian P. Cardioprotective Effects of Methanolic Extract of *Scrophularia frigida* on Ischemia-Reperfusion-Induced Injuries in Isolated Rat Heart. *Iran J Pharm Res*. 2017;16(Suppl):35-45.
87. Bacui Y, Ting W, Bo Z, et al. Protective Effects of Total Flavonoids from *Dracocephalum moldavica* L. on Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in the Isolate Rats Heart. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2013;7:53-7.
88. Gautam R, Jachak SM. Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Medicinal research reviews*. 2009;29(5):767-820.
89. Pushpa K, Mahesh K. An overview on plants with anti-inflammatory potential. *Int J Curr Pharm Res*. 2017;9(5):1-4.

90. Kumar V, Bhat ZA, Kumar D, et al. Evaluation of anti-inflammatory potential of leaf extracts of *Skimmia anquetilia*. Asian Pacific journal of tropical biomedicine. 2012;2(8):627-30.
91. Vishal V, Sharma GN, Mukesh G, et al. A review on some plants having anti-inflammatory activity. Journal of Phytopharmacology. 2014;2:214-21.
92. Coleman JW. Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. Clinical Experimental Immunology 2002;129:4-10.
93. Iwalewa E, McGaw L, Naidoo V, et al. Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. African Journal of Biotechnology 2007;6:2868-288.
94. Kumar V, Bhat ZA, Kumar D, et al. In-vitro anti-inflammatory activity of leaf extracts of *Basella alba* linn. Var. alba. Int J Drug Dev & Res. 2011;3(2):124–7.
95. Akiyama H, Barger S, Barnum S, et al. Inflammation and Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging. 2000;21:383–421
96. Azeem AK, Dilip C, Prasanth SS, et al. Anti-inflammatory activity of the glandular extracts of *Thunus alalunga*. Asia Pac J Med. 2010;3(10):412–20.
97. Arivazhagan S, Balasenthi S, Nagini S. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Mallotusoppostifolium*. J Phytother Res 2000;14:291-93.
98. Kumarappan CT, Chandra R, Mandal SC. Anti-inflammatory activity of *Ichnocarpusfrutescens*. Pharmacologyonline 2006;3:201-6
99. Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. J Pharmacol Sci. 2004;96(3):229-45.
100. SouzaEPBSS, FariaRX, RochaLM. Clinical trials studies of plant extracts with anti-inflammatory activity. J App Pharm Sci, 2016; 6(12): 224-232.
101. Walker B, Barrett S, Polasky S, Galaz V, Folke C, Engström G, Ackerman F, Arrow K, Carpenter S, Chopra K, Daily G, Ehrlich P, Hughes T, Kautsky N, Levin S, Mäler KG, Shogren J, Vincent J, Xepapadeas T, de Zeeuw A. Environment. Looming global-scale failures and missing institutions. Science. 2009; 325(5946): 1345-6.
102. Awouafack MD, McGaw LJ, Gottfried S, Mbouangouere R, Tane P, Spitteller M, Eloff JN. Antimicrobial activity and cytotoxicity of the ethanol extract, fractions and eight compounds isolated from *Eriosema robustum* (Fabaceae). BMC Complement Altern Med. 2013; 13: 289.

103. Srivastava J, Chandra H, Nautiyal AR, Kalra SJ. Antimicrobial resistance (AMR) and plant-derived antimicrobials (PDA(m)s) as an alternative drug line to control infections. *3 Biotech*. 2014; 4(5): 451-60.
104. Sánchez E, Rivas Morales C, Castillo S, Leos-Rivas C, García-Becerra L, Ortiz Martínez DM. Antibacterial and Antibiofilm Activity of Methanolic Plant Extracts against Nosocomial Microorganisms. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2016; 2016: 1572697.
105. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2015; 13(1): 42-51.
106. Silva NC, Fernandes Júnior A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 2010; 16(3): 402-13.
107. Taguri T, Tanaka T, Kouno I. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biol Pharm Bull*. 2004; 27(12): 1965-9.
108. Karuppiah P, Mustaffa M. Antibacterial and antioxidant activities of *Musa* sp. leaf extracts against multidrug resistant clinical pathogens causing nosocomial infection. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013; 3(9): 737-42.
109. Dorman HJ, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol*. 2000; 88(2): 308-16.
110. Talib WH, Mahasneh AM. Antimicrobial, cytotoxicity and phytochemical screening of Jordanian plants used in traditional medicine. *Molecules*. 2010; 15(3): 1811-24.
111. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 2003; 552(2): 335-44.
112. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010; 4(8): 118-26.
113. Bagchi K, Puri S. Free radicals and antioxidants in health and disease. *East Mediterr Health J*. 1998; 4: 350-60
114. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39(1): 44-84.
115. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem*. 2015; 30(1): 11-26.

116. Iskusnykh IY, Popova TN, Agarkov AA, Pinheiro de Carvalho MÂ, Rjevskiy SG. Expression of Glutathione Peroxidase and Glutathione Reductase and Level of Free Radical Processes under Toxic Hepatitis in Rats. *J Toxicol.* 2013; 2013: 870628.
117. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens.* 2000; 18(6): 655-73.
118. Münzel T, Camici GG, Maack C, Bonetti NR, Fuster V, Kovacic JC. Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature: Part 2 of a 3-Part Series. *J Am Coll Cardiol.* 2017; 70(2): 212-29.
119. Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol.* 2015; 6: 524-51.
120. Mattera R, Benvenuto M, Giganti MG, Tresoldi I, Pluchinotta FR, Bergante S, Tettamanti G, Masuelli L, Manzari V, Modesti A, Bei R. Effects of Polyphenols on Oxidative Stress-Mediated Injury in Cardiomyocytes. *Nutrients.* 2017; 9(5): 523.
121. Hijazi A, Al Masri DS, Farhan H, Nasser M, Rammal H, Annan H. Effect of different ethanol concentrations, using different extraction techniques, on the antioxidant capacity of Lebanese *Eryngium creticum*. *IJPCBS.* 2015; 3(2): 262-71.
122. Orčić D, Francišković M, Bekvalac K, Svirčev E, Beara I, Lesjak M, Mimica-Dukić N. Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food Chem.* 2014; 143: 48-53.
123. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Meth. Enzymol.* 1999; 299: 152-78
124. Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal.* 2002; 10(3): 178-82.
125. Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* 1998; 76(2): 270-6.
126. Orčić DZ, Mimica-Dukić NM, Francišković MM, Petrović SS, Jovin ED. Antioxidant activity relationship of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. *Chem Cent J.* 2011; 5: 34.
127. Andrews JM; BSAC Working Party on Susceptibility Testing. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 4). *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(1): 60-76.

128. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*. 2007; 42(4): 321-4.
129. Banfi E, Scialino G, Monti-Bragadin C. Development of a microdilution method to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 52(5): 796-800.
130. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol*. 1985; 22(6): 996-1006.
131. O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol*. 1998; 30(2): 295-304.
132. Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68(6): 2950-8.
133. Mendez C, Garza E, Gulati P, Morris PA, Allen CC. Isolation and identification of microorganisms in JSC Mars-1 simulant soil. *Lunar Planet Sci*. 2005; 36: 1-2.
134. Ganga RB, Madhu KP, Vijaya RA. Investigation of antioxidant and anti-inflammatory activity of leaves of *Dalbergia paniculata* (Roxb). *Asian Pac J Trop Med*. 2012;5(6):455-8.
135. Aouey B, Samet AM, Fetoui H, Simmonds MSJ, Bouaziz M. Anti-oxidant, anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of grapevine leaf extract (*Vitis vinifera*) in mice and identification of its active constituents by LC-MS/MS analyses. *Biomed Pharmacother*. 2016;84:1088-1098.
136. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979; 95(2): 351-8.
137. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982; 126(1): 131-8.
138. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press Une, Boca Raton. 1985; 123-32
139. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods*. 1980; 38(1-2): 161-70.

140. Beutler E. Catalase. In: Beutler E, ed. Red cell metabolism, a manual of biochemical methods. New York: Grune and Stratton 1982; 105-106.
141. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J Biol Chem. 1972; 247(10): 3170-5.
142. Beutler E. Superoxide dismutase. In: Beutler E, ed. Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods. Philadelphia: Grune and Stratton; 1984:83-85.
143. Beutler E. Reduced glutathione (GSH). In: Beutler E, ed. Red cell metabolism, a manual of biochemical methods. New York: Grune and Stratton; 1975;112-114
144. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining oftissue and cell sections. CSH Protoc. 2008;2008: pdb.prot4986.
145. Sadeghi N, Dianat M, Badavi M, et al. Cardioprotective effect of aqueous extract of *Chichorium intybus* on ischemia-reperfusion injury in isolated rat heart. Avicenna journal of phytomedicine. 2015;5(6):568.
146. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. Behav Res Methods. 2007; 39(2): 175-91.
147. Iloki-Assanga SB, Lewis-Luján LM, Lara-Espinoza CL, Gil-Salido AA, Fernandez-Angulo D, Rubio-Pino JL, Haines DD. Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucida buceras* L. and *Phoradendron californicum*. BMC Res Notes. 2015; 8(1): 396.
148. Loganayaki N, Siddhuraju P, Manian S. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of phenolic extracts from *Helicteres isora* L. and *Ceiba pentandra* L. J Food Sci Technol. 2013; 50(4): 687-95.
149. Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. J Food Sci Technol. 2011; 48(4): 412-22.
150. Ndhlala AR, Moyo M, Van Staden J. Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules? Molecules. 2010; 15(10): 6905-30.
151. Dutra RC, Leite MN, Barbosa NR. Quantification of phenolic constituents and antioxidant activity of *Pterodon emarginatus* vogel seeds. Int J Mol Sci. 2008; 9(4): 606-14.

152. Alkhalid AS, Hossain MA. Study on total phenolics and antioxidant activity of leaves crude extracts of *Annona squamosa* traditionally used for the treatment of cancerous tumours. *Asian Pac J Trop Dis*. 2015; 5: 142-4.
153. Elisha IL, Botha FS, McGaw LJ, Eloff JN. The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. *BMC Complement Altern Med*. 2017; 17(1): 133.
154. Al-Mariri A, Safi M. In Vitro Antibacterial Activity of Several Plant Extracts and Oils against Some Gram-Negative Bacteria. *Iran J Med Sci*. 2014; 39(1): 36-43.
155. Inácio MC, Paz TA, Bertoni BW, Pereira AM. Effect of environmental and phenological factors on the antimicrobial activity of *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. roots. *Acta Scientiarum. Agronomy*. 2016; 38(4): 467-73.
156. Miquel S, Lagrèfeuille R, Souweine B, Forestier C. Anti-biofilm Activity as a Health Issue. *Front Microbiol*. 2016; 7: 592.
157. Nair S, Desai S, Poonacha N, Vipra A, Sharma U. Antibiofilm Activity and Synergistic Inhibition of *Staphylococcus aureus* Biofilms by Bactericidal Protein P128 in Combination with Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60(12): 7280-9.
158. Quave CL, Plano LR, Pantuso T, Bennett BC. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol*. 2008; 118(3): 418-28.
159. Das K, Tiwari RKS, Shrivastava DK. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends. *J Med Plants Res*. 2010; 4(2): 104-11.
160. Elisha IL, Botha FS, McGaw LJ, Eloff JN. The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. *BMC Complement Altern Med*. 2017; 17(1): 133.
161. Babii C, Mihalache G, Bahrin LG, Neagu AN, Gostin I, Mihai CT, Sârbu LG, Birsa LM, Stefan M. A novel synthetic flavonoid with potent antibacterial properties: In vitro activity and proposed mode of action. *PLoS One*. 2018; 13(4): e0194898.
162. Ulanowska K, Tkaczyk A, Konopa G, Wegrzyn G. Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch Microbiol*. 2006; 184(5): 271-8.

163. Farhadi F, Khameneh B, Iranshahi M, Iranshahi M. Antibacterial activity of flavonoids and their structure-activity relationship: An update review. *Phytother Res.* 2019; 33(1): 13-40.
164. Verghese J, Nguyen T, Oppgaard LM, Seivert LM, Hiasa H, Ellis KC. Flavone-based analogues inspired by the natural product simocyclinone D8 as DNA gyrase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013; 23(21): 5874-7.
165. Lou Z, Wang H, Zhu S, Ma C, Wang Z. Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. *J Food Sci.* 2011; 76(6): M398-403.
166. Chen CZ, Cooper SL. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes. *Biomaterials.* 2002; 23(16): 3359-68.
167. Yi SM, Zhu JL, Fu LL, Li JR. Tea polyphenols inhibit *Pseudomonas aeruginosa* through damage to the cell membrane. *Int J Food Microbiol.* 2010; 144(1): 111-7.
168. Górnjak I, Bartoszewski R, Króliczewski J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochem Rev.* 2019; 18(1): 241-72.
169. Wang Y, Lee SM, Dykes GA. Potential mechanisms for the effects of tea extracts on the attachment, biofilm formation and cell size of *Streptococcus mutans*. *Biofouling.* 2013; 29(3): 307-18.
170. Gupta A, Dwivedi M, Mahdi AA, Nagana Gowda GA, Khetrapal CL, Bhandari M. Inhibition of adherence of multi-drug resistant *E. coli* by proanthocyanidin. *Urol Res.* 2012; 40(2): 143-50.
171. Dey D, Debnath S, Hazra S, Ghosh S, Ray R, Hazra B. Pomegranate pericarp extract enhances the antibacterial activity of ciprofloxacin against extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and metallo- β -lactamase (MBL) producing Gram-negative bacilli. *Food Chem Toxicol.* 2012; 50(12): 4302-9.
172. Gröblacher B, Kunert O, Bucar F. Compounds of *Alpinia katsumadai* as potential efflux inhibitors in *Mycobacterium smegmatis*. *Bioorg Med Chem.* 2012; 20(8): 2701-6.
173. Eumkeb G, Chukrathok S. Synergistic activity and mechanism of action of ceftazidime and apigenin combination against ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae*. *Phytomedicine.* 2013; 20(3-4): 262-9.
174. Navarro-Martínez MD, Navarro-Perán E, Cabezas-Herrera J, Ruiz-Gómez J, García-Cánovas F, Rodríguez-López JN. Antifolate activity of epigallocatechin gallate against *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(7): 2914-20.

175. Ding S, Jiang H, Fang J. Regulation of Immune Function by Polyphenols. *J Immunol Res.* 2018; 2018: 1264074.
176. Carey MW, Rao NV, Kumar BR, Mohan GK. Anti-inflammatory and analgesic activities of methanolic extract of *Kigelia pinnata* DC flower. *J Ethnopharmacol.* 2010; 130(1): 179-82.
177. Singh S, Kaur M, Singh A, Kumar B. Pharmacological evaluation of Anti-inflammatory and Anti-ulcer potential of heartwood of *Santalum album* in rats. *AJBPR.* 2014; 4(1): 140-53.
178. Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, Rossi A, Parente L, Sautebin L, Cirino G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br J Pharmacol.* 2004; 142(2): 331-8.
179. Saini AK, Goyal R, Gauttam VK, Kalia AN. Evaluation of anti-inflammatory potential of *Ricinus communis* Linn leaves extracts and its flavonoids content in Wistar rats. *J Chem Pharm Res.* 2010; 2(5): 690-5.
180. El Jemli M, Kamal R, Marmouzi I, Doukkali Z, Boudida EH, Touati D, Nejjar R, El Guessabi L, Cherrah Y, Alaoui K. Chemical composition, acute toxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of Moroccan *Tetraclinis articulate* L. *J Tradit Complement Med.* 2016; 7(3): 281-7.
181. Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci.* 2004; 96(3): 229-45.
182. Rathee, P., Chaudhary, H., Rathee, S., Rathee, D., Kumar, V., & Kohli, K. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2009; 8(3): 229-35.
183. Yui K, Imataka G, Nakamura H, Ohara N, Naito Y. Eicosanoids Derived From Arachidonic Acid and Their Family Prostaglandins and Cyclooxygenase in Psychiatric Disorders. *Curr Neuropharmacol.* 2015; 13(6): 776-85.
184. Liang N, Kitts DD. Role of Chlorogenic Acids in Controlling Oxidative and Inflammatory Stress Conditions. *Nutrients.* 2015; 8(1): 16.
185. Kimata M, Shichijo M, Miura T, Serizawa I, Inagaki N, Nagai H. Effects of luteolin, quercetin and baicalein on immunoglobulin E-mediated mediator release from human cultured mast cells. *Clin Exp Allergy.* 2000; 30(4): 501-8.
186. Shin HS, Satsu H, Bae MJ, Zhao Z, Ogiwara H, Totsuka M, Shimizu M. Anti-inflammatory effect of chlorogenic acid on the IL-8 production in Caco-2 cells and the

- dextran sulphate sodium-induced colitis symptoms in C57BL/6 mice. *Food Chem.* 2015; 168: 167-75.
187. Melillo de Magalhães P, Dupont I, Hendrickx A, Joly A, Raas T, Dessy S, Sergent T, Schneider YJ. Anti-inflammatory effect and modulation of cytochrome P450 activities by *Artemisia annua* tea infusions in human intestinal Caco-2 cells. *Food Chem.* 2012; 134(2): 864-71.
188. Kim JS, Jobin C. The flavonoid luteolin prevents lipopolysaccharide-induced NF-kappaB signalling and gene expression by blocking IkappaB kinase activity in intestinal epithelial cells and bone-marrow derived dendritic cells. *Immunology.* 2005; 115(3): 375-87.
189. Rao YK, Fang SH, Tzeng YM. Antiinflammatory activities of flavonoids and a triterpene caffeate isolated from *Bauhinia variegata*. *Phytother Res.* 2008; 22(7): 957-62.
190. Xu DP, Li Y, Meng X, Zhou T, Zhou Y, Zheng J, Zhang JJ, Li HB. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(1): 96.
191. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2011; 15(6): 1583-606.
192. Chen YW, Chou HC, Lin ST, Chen YH, Chang YJ, Chen L, Chan HL. Cardioprotective Effects of Quercetin in Cardiomyocyte under Ischemia/Reperfusion Injury. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; 2013: 364519.
193. Mattera R, Benvenuto M, Giganti MG, Tresoldi I, Pluchinotta FR, Bergante S, Tettamanti G, Masuelli L, Manzari V, Modesti A, Bei R. Effects of Polyphenols on Oxidative Stress-Mediated Injury in Cardiomyocytes. *Nutrients.* 2017; 9(5): 523.
194. Louis XL, Thandapilly SJ, Kalt W, Vinqvist-Tymchuk M, Aloud BM, Raj P, Yu L, Le H, Netticadan T. Blueberry polyphenols prevent cardiomyocyte death by preventing calpain activation and oxidative stress. *Food Funct.* 2014; 5(8): 1785-94.
195. Di Meo F, Lemaur V, Cornil J, Lazzaroni R, Duroux JL, Olivier Y, Trouillas P. Free radical scavenging by natural polyphenols: atom versus electron transfer. *J Phys Chem A.* 2013; 117(10): 2082-92.
196. Ozgen S, Kivilcim Kilinc O, Selamoğlu Z. Antioxidant Activity of Quercetin: A Mechanistic Review. *Turkish Journal of Agriculture- Food Science and Technology.* 2016; 4(12): 1134-1138.

197. Akhlaghi M, Foshati S. Bioavailability and metabolism of flavonoids: A review. *Int J Nutr Sci.* 2017; 2: 180-4.
198. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal.* 2013; 2013: 162750.
199. Wang H, Sim MK, Loke WK, Chinnathambi A, Alharbi SA, Tang FR, Sethi G. Potential Protective Effects of Ursolic Acid against Gamma Irradiation-Induced Damage Are Mediated through the Modulation of Diverse Inflammatory Mediators. *Front Pharmacol.* 2017; 8: 352.
200. Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia.* 2011; 82(4): 513-23.
201. Ward NC, Hodgson JM, Croft KD, Burke V, Beilin LJ, Puddey IB. The combination of vitamin C and grape-seed polyphenols increases blood pressure: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Hypertens.* 2005; 23(2): 427-34.
202. Kizhakekuttu TJ, Widlansky ME. Natural antioxidants and hypertension: promise and challenges. *Cardiovasc Ther.* 2010; 28(4): e20-32.
203. Ahmad A, Hossain MM, Singhal U, Islam N. Comparative study of marker of oxidative stress among normotensive, pre-hypertensive and hypertensive patients. *Biomed Res.* 2013; 24: 491-5.
204. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci.* 2016; 5: e47.
205. Talukder MA, Kalyanasundaram A, Zuo L, Velayutham M, Nishijima Y, Periasamy M, Zweier JL. Is reduced SERCA2a expression detrimental or beneficial to postischemic cardiac function and injury? Evidence from heterozygous SERCA2a knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 294(3): H1426-34.
206. Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Inseste J, Rodriguez-Sinovas A, Piper HM. Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2012; 94(2): 168-80.
207. Misquitta CM, Mwanjewe J, Nie L, Grover AK. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump mRNA stability in cardiac and smooth muscle: role of the 3'-untranslated region. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002; 283(2): 560-8.
208. Lipskaia L, Chemaly ER, Hadri L, Lompre AM, Hajjar RJ. Sarcoplasmic reticulum Ca(2+) ATPase as a therapeutic target for heart failure. *Expert Opin Biol Ther.* 2010; 10(1): 29-41.

209. Zhu S, Xu T, Luo Y, Zhang Y, Xuan H, Ma Y, Pan D, Li D, Zhu H. Luteolin Enhances Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase Activity through p38 MAPK Signaling thus Improving Rat Cardiac Function after Ischemia/Reperfusion. *Cell Physiol Biochem*. 2017; 41(3): 999-1010.
210. Santos MS, Oliveira ED, Santos-Miranda A, Cruz JS, Gondim ANS, Menezes-Filho JER, Souza DS, Pinho-da-Silva L, Jesus ICG, Roman-Campos D, Guatimosim S, Lara A, Conde-Garcia EA, Vasconcelos CML. Dissection of the Effects of Quercetin on Mouse Myocardium. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2017; 120(6): 550-9.
211. Kanno Y, Watanabe R, Zempo H, Ogawa M, Suzuki J, Isobe M. Chlorogenic acid attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Int Heart J*. 2013; 54(3): 176-80.
212. Angelone T, Pasqua T, Di Majo D, Quintieri AM, Filice E, Amodio N, Tota B, Giammanco M, Cerra MC. Distinct signalling mechanisms are involved in the dissimilar myocardial and coronary effects elicited by quercetin and myricetin, two red wine flavonols. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2011; 21(5): 362-71.
213. Viskupicova J, Strosova M, Sturdik E, Horakova L. Modulating effect of flavonoids and their derivatives on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase oxidized by hypochloric acid and peroxynitrite. *Neuro Endocrinol Lett*. 2009; 30 Suppl 1: 148-51.
214. Duarte J, Francisco V, Perez-Vizcaino F. Modulation of nitric oxide by flavonoids. *Food Funct*. 2014; 5(8): 1653-68.
215. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829-37, 837a-837d.
216. Yu X, Ge L, Niu L, Lian X, Ma H, Pang L. The Dual Role of Inducible Nitric Oxide Synthase in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: Friend or Foe? *Oxid Med Cell Longev*. 2018; 2018: 8364848.
217. Liu VW, Huang PL. Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. *Cardiovasc Res*. 2008; 77(1): 19-29.
218. Scherrer-Crosbie M, Ullrich R, Bloch KD, Nakajima H, Nasser B, Aretz HT, Lindsey ML, Vançon AC, Huang PL, Lee RT, Zapol WM, Picard MH. Endothelial nitric oxide synthase limits left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation*. 2001; 104(11): 1286-91.
219. Brunner F, Maier R, Andrew P, Wölkart G, Zechner R, Mayer B. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res*. 2003; 57(1): 55-62.

220. Testai L, Martelli A, Cristofaro M, Breschi MC, Calderone V. Cardioprotective effects of different flavonoids against myocardial ischaemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts. *J Pharm Pharmacol*. 2013; 65(5): 750-6.
221. Lu X, Bi YW, Chen KB. Olmesartan restores the protective effect of remote ischemic preconditioning against myocardial ischemia/reperfusion injury in spontaneously hypertensive rats. *Clinics (Sao Paulo)*. 2015; 70(7): 500-7.
222. Balakumar P, Singh H, Singh M, Anand-Srivastava MB. The impairment of preconditioning-mediated cardioprotection in pathological conditions. *Pharmacol Res*. 2009; 60(1): 18-23.
223. Vinten-Johansen J, Granfeldt A, Mykytenko J, Undyala VV, Dong Y, Przyklenk K. The multidimensional physiological responses to postconditioning. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 14(5): 791-810.
224. Mozaffari MS, Schaffer SW. Effect of hypertension and hypertension-glucose intolerance on myocardial ischemic injury. *Hypertension*. 2003; 42(5): 1042-9.
225. Elnakish MT, Hassanain HH, Janssen PM. Vascular remodeling-associated hypertension leads to left ventricular hypertrophy and contractile dysfunction in profilin-1 transgenic mice. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2012; 60(6): 544-52.
226. Li Q, Youn JY, Cai H. Mechanisms and consequences of endothelial nitric oxide synthase dysfunction in hypertension. *J Hypertens*. 2015; 33(6): 1128-36.
227. Debnath J, Nath LK. A review on pathophysiology of ischemic-reperfusion injury of heart and ameliorating role of flavonoids and polyphenols. *J Med Plant Res*. 2014; 8(16): 607-14.
228. Monsalve B, Concha-Meyer A, Palomo I, Fuentes E. Mechanisms of Endothelial Protection by Natural Bioactive Compounds from Fruit and Vegetables. *An Acad Bras Cienc*. 2017; 89(1 Suppl 0): 615-33.
229. Carrick D, Haig C, Maznyczka AM, Carberry J, Mangion K, Ahmed N, Yue May VT, McEntegart M, Petrie MC, Eteiba H, Lindsay M, Hood S, Watkins S, Davie A, Mahrous A, Mordi I, Ford I, Radjenovic A, Welsh P, Sattar N, Wetherall K, Oldroyd KG, Berry C. Hypertension, Microvascular Pathology, and Prognosis After an Acute Myocardial Infarction. *Hypertension*. 2018; 72(3): 720-30.
230. Wang X, Han M, Bao J, Tu W, Dai Z. A superoxide anion biosensor based on direct electron transfer of superoxide dismutase on sodium alginate sol-gel film and its application to monitoring of living cells. *Anal Chim Acta*. 2012; 717: 61-6.

231. Darra E, Rungatscher A, Carcereri de Prati A, Podesser BK, Faggian G, Scarabelli T, Mazzucco A, Hallström S, Suzuki H. Dual modulation of nitric oxide production in the heart during ischaemia/reperfusion injury and inflammation. *Thromb Haemost.* 2010; 104(2): 200-6.
232. Breton-Romero R, Lamas S. Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells. *Redox biology.* 2014; 2: 529-34.
233. Madamanchi NR, Runge MS. Redox signaling in cardiovascular health and disease. *Free Radic Biol Med.* 2013; 61: 473-501.
234. Kurian GA, Rajagopal R, Vedantham S, Rajesh M. The Role of Oxidative Stress in Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury and Remodeling: Revisited. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: 1656450.
235. González J, Valls N, Brito R, Rodrigo R. Essential hypertension and oxidative stress: New insights. *World J Cardiol.* 2014; 6(6): 353-66.
236. Besík J, Szárszoi O, Kunes J, Netuka I, Malý J, Kolár F, Pirk J, Ostádal B. Tolerance to acute ischemia in adult male and female spontaneously hypertensive rats. *Physiol Res.* 2007; 56(3): 267-74.
237. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014; 2014: 360438.
238. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest.* 2013; 123(1): 92-100.
239. Rodrigo R, Libuy M, Feliú F, Hasson D. Oxidative stress-related biomarkers in essential hypertension and ischemia-reperfusion myocardial damage. *Dis Markers.* 2013; 35(6): 773-90.
240. Rodiño-Janeiro BK, Paradela-Dobarro B, Castiñeiras-Landeira MI, Raposeiras-Roubín S, González-Juanatey JR, Alvarez E. Current status of NADPH oxidase research in cardiovascular pharmacology. *Vasc Health Risk Manag.* 2013; 9: 401-28.
241. Neri M, Riezzo I, Pascale N, Pomara C, Turillazzi E. Ischemia/Reperfusion Injury following Acute Myocardial Infarction: A Critical Issue for Clinicians and Forensic Pathologists. *Mediators Inflamm.* 2017; 2017: 7018393.