



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Милош З. Кривокапић

**ИСПИТИВАЊЕ АНТИМИКРОБНИХ,
АНТИИНФЛАМАЦИЈСКИХ, АНТИОКСИДАЦИОНИХ И
КАРДИОПРОТЕКТИВНИХ ЕФЕКТА ЕКСТРАКТА
СРЕМУША, *ALLIUM URSINUM L***

докторска дисертација

Крагујевац, 2021



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Miloš Z. Krivokapić

**ASSESSMENT OF ANTIMICROBIAL, ANTI-INFLAMMATORY,
ANTIOXIDANT AND CARDIOPROTECTIVE EFFECTS OF WILD
GARLIC EXTRACT, *ALLIUM URSINUM L***

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2021

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Аутор	
Име и презиме: Милош Кривокапић	
Датум и место рођења: 22.09.1991., Подгорица, Црна Гора	
Садашње запослење: Медицински факултет, Универзитет Црне Горе	
Докторска дисертација	
Наслов: Испитивање антимикробних, антиинфламацијских, антиоксидационих и кардиопротективних ефеката екстракта сремуса, <i>Allium ursinum L</i>	
Број страница: 115	
Број слика: 8	
Број библиографских података: 169	
Установа и место где је рад израђен: Лабораторија за кардиоваскуларну физиологију, Институт Факултета медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац	
Научна област (УДК): медицина	
Ментор: др сци. мед. Марина Томовић, ванредни професор, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу	
Оцена и одбрана	
Датум пријаве теме: 22.03.2018. године	
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-03-449/24 од 06.06.2018. године	
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:	
1. Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Физиологија</i> , председник;	
2. Проф. др Сергеј Бољевић (Болевич Сергей Бранкович), редовни професор Првог државног московског универзитета „И.М. Сеченов”, Москва, Руска Федерација, за ужу научну област <i>Патологија</i> , члан;	
3. Проф. др Марија Миловановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Микробиологија и имунологија</i> , члан;	
4. Проф. др Снежана Цупара, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Фармацеутска технологија</i> , члан;	
5. Доц. др Александар Арсенијевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Онкологија</i> , члан.	
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:	
Датум одбране дисертације:	

DOCTORAL DISSERTATION IDENTIFICATION PAGE

Author
Name and surname: Miloš Krivokapić
Date and place of birth: 22.09.1991., Podgorica, Montenegro
Current employment: Medical Faculty, University of Montenegro
Doctoral disseration
Title: Assessment of antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant and cardioprotective effects of wild garlic extract, <i>Allium ursinum</i> L
Number of pages: 115
Number of images: 8
Number of bibliographic data: 169
Institution and place where the work was made: Laboratory for Cardiovascular Physiology, Institute of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac
Scientific area (UDC): Medicine
Mentor: Dr sci med Marina Tomović, Associate Professor, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 22.03.2018.
Decision number and date of acceptance of doctoral dissertation topic: IV-03-449/24 from 06.06.2018.
Comission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate: <ol style="list-style-type: none">6. Prof. Dr. Vladimir Jakovljević, full professor, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Physiology, President;7. Prof. Dr. Sergey Brankovich Bolevich, full professor of the First Moscow State University, "I.M. Sechenov", Moscow, Russian Federation, for the narrower scientific field of Pathology, member;8. Prof. Marija Milovanović, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Microbiology and Immunology, member;9. Prof. Dr. Snežana Cupara, Associate Professor, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Pharmaceutical Technology, member;10. Doc. dr Aleksandar Arsenijević, Assistant professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Oncology, member.
Comission for evaluation and defense of doctoral/artistic dissertation:
Date of Dissertation Defense:

САЖЕТАК

Циљ ове студије био је испитивање антимикробних, антиоксидационих, антиинфламацијских и кардиопротективних ефеката екстраката листа сремуша (*Allium ursinum* L). За одређивање антимикробних ефеката коришћен је микродилуциони тест, док је за испитивање антиинфламацијског потенцијала коришћен модел инфламације изазване карагенином на шапи пацова. За испитивање антиинфламацијског ефекта укључено је 50 пацова подељених у пет група: пацови на третману 0,9% NaCl, пацови на третману индометацином и пацови третирани екстрактом сремуша у три дозе-50, 100 и 200 mg/kg интраперитонеално (i.p.). За испитивање кардиопротективних ефеката екстракта сремуша коришћен је модел ретроградне перфузије по *Langendorff*-у. У овај део експеримента укључено је 80 пацова подељених у 8 група: здрави и спонтано хипертензивни пацови (SHR) који су конзумирали екстракт сремуша у дози од 125 mg/kg, 250 mg/kg и 500 mg/kg per os током 28 дана. У узорцима коронарног венског ефлуента одређивани су нивои прооксиданаса, док је из узорака венске крви одређиван системски редок статус. Резултати су показали генерално слабо антибактеријско и антигљивично деловање екстраката сремуша које је било зависно од врсте микроорганизама и типа екстракта. Метанолни екстракт сремуша у дози од 200 mg/kg испољио је најинтензивнији ефекат у редукацији инфламације шапе изазване карагенином. Додатно, унос екстракта сремуша током 28 дана значајно је допринео опоравку срчане функције и ублажио оксидациона оштећења срца. Екстракт сремуша испољио је потенцијал ка модулацији системске редокс равнотеже и истакао се као снажан антиоксиданс. Беневити ове биљне врсте уочени су како на моделу здравих тако и код SHR пацова при чему су израженији ефекти били присутни након уноса више дозе екстракта. Резултати ове докторске дисертације указују на значајну улогу екстракта сремуша у кардиопротекцији и снажно антиоксидационо деловање што указује на могућност његовог коришћења самостално у превенцији или као адјувантна антиоксидациона терапија код кардиоваскуларних болести.

Кључне речи: *Allium ursinum*, инфламација, исхемијско-реперфузиона повреда срца, оксидациони стрес

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory and cardioprotective effects of *Allium ursinum* L extracts. A microdilution test was used to determine the antimicrobial effects, while a model of carrageenan-induced inflammation in rat paws was used to examine the anti-inflammatory potential. To examine the anti-inflammatory effect, 50 rats were divided into five groups: rats treated with 0.9% NaCl, rats treated with indomethacin and rats treated with wild garlic extract in three doses - 50, 100 and 200 mg / kg intraperitoneally (i.p.). A *Langendorff* retrograde perfusion model was used to examine the cardioprotective effects of wild garlic extract. This part of the experiment included 80 rats divided into 8 groups: healthy and spontaneously hypertensive rats (SHR) who consumed sremus extracts at a dose of 125 mg/kg, 250 mg/kg and 500 mg/kg per os for 28 days. Levels of pro-oxidants were determined in coronary venous effluent samples, while systemic redox status was determined in venous blood samples. Our results showed a generally weak antibacterial and antifungal effect of wild garlic extract, which was dependent on the type of microorganism and extract. Methanol extract of wild garlic at a dose of 200 mg/kg showed the most intensive effect in reducing paw inflammation caused by carrageenan. In addition, intake of wild garlic extract for 28 days significantly contributed to the recovery of cardiac function and alleviated oxidative damage to the heart. Wild garlic extract showed the potential to modulate the systemic redox balance and stood out as a powerful antioxidant. Benefits of this plant species were observed in both the model of healthy and SHR rats, with more pronounced effects observed after intake of a higher dose of the extract. The results of this doctoral thesis indicate a significant role of wild garlic extract in cardioprotection and strong antioxidant activity, which indicates the possibility of its use alone in prevention or as adjuvant antioxidant therapy in cardiovascular diseases.

Key words: *Allium ursinum*, inflammation, myocardial ischemia reperfusion injury, oxidative stress

Садржај

1. УВОД.....	1
1.1 Основне карактеристике сремуша	2
1.1.1 Етимологија	2
1.1.2. Опис и таксономија сремуша	2
1.1.3. Распрострањеност сремуша.....	2
1.2. Хемијски састав сремуша	3
1.2.1 Сумпорна једињења сремуша.....	3
1.2.2 Фенолна једињења сремуша.....	6
1.2.3 Стероидни гликозиди.....	8
1.3. Значај сремуша	9
1.3.1. Улога сремуша у нутрицији	9
1.3.2. Лековита својства сремуша	10
1.4. Коронарна болест срца	13
1.4.1. Улога сремуша у прекондиционирању миокарда	14
1.5. Инфективне болести	15
1.5.1. Улога сремуша у лечењу инфективних болести	15
1.6. Инфламација и инфламаторне болести.....	16
1.6.1. Улога сремуша у инфламацији	16
1.7. Оксидациони стрес: улога сремуша	17
2. ЦИЉЕВИ.....	19
2.1. Општи циљеви.....	20
2.2. Специфични циљеви	20
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД	21
3.1 Етички аспекти	22
3.2 Припрема биљног материјала и процес екстракције	22
3.3. Хемијска анализа екстраката.....	22
3.3.1. Одређивање садржаја специфичних једињења HPLC-MS/MS техником	22
3.3.2. Одређивање укупног садржаја фенола.....	23
3.3.3. Одређивање укупног садржаја флавоноида.....	24
3.4. Одређивање способности екстраката да неутралишу DPPH· радикал.....	24
3.4.1. Реагенси.....	24
3.4.2. Поступак.....	24
3.5. Одређивање антимикуробне активности екстраката сремуша	25
3.5.1. Супстанце.....	25
3.5.2. Тестирани микроорганизми.....	25
3.5.3. Припрема суспензије.....	26

3.5.4. Поступак.....	26
3.6. Одређивање антиинфламаторне активности екстракта сремуша.....	26
3.6.1. Супстанце.....	26
3.6.2. Експериментална процедура.....	26
3.6.3. Процена антиедематозне активности екстракта.....	27
3.7. Одређивање ефеката екстракта сремуша на системски редокс статус и <i>ex vivo</i> И-Р повреду пацова.....	27
3.7.1. Експерименталне животиње.....	28
3.7.2. Одређивање системског редокс статуса.....	28
3.7.3. Испитивање <i>ex vivo</i> функције срца.....	33
3.8. Испитивање ефеката екстракта сремуша на срчани редокс статус.....	35
3.9. Хистопатолошка анализа.....	35
3.10. Снага студије и величина узорка.....	36
3.11. Статистичка обрада података.....	36
4. РЕЗУЛТАТИ.....	37
4.1. Хемијска анализа екстракта сремуша.....	38
4.1.1. Садржај одабраних полифенолних једињења у екстрактима сремуша.....	38
4.1.2. Садржај укупних фенола и флавоноида у екстрактима сремуша.....	39
4.2. Капацитет екстракта сремуша да неутралишу DPPH [•] радикал.....	40
4.3. Антимикробни ефекти екстракта сремуша.....	40
4.4. Антиинфламацијски ефекти екстракта сремуша.....	42
4.5. Утицај екстракта сремуша на маркере оксидационог стреса у крви пацова.....	42
4.5.1. Ефекти екстракта сремуша на системски редокс статус здравих пацова.....	42
4.5.2. Ефекти екстракта сремуша на системски редокс статус спонтано хипертензивних пацова.....	45
4.6. Утицај екстракта сремуша на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова.....	48
4.6.1. Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока нетретираних здравих и хипертензивних пацова.....	48
4.6.2. Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока изолованог срца здравих пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 125 mg/kg.....	49
4.6.3. Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока изолованог срца здравих пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 250 mg/kg.....	51
4.6.4. Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока изолованог срца здравих пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 500 mg/kg.....	53
4.6.5. Поређење ефеката растућих доза екстракта сремуша на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца здравих пацова.....	56
4.6.7. Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока изолованог срца спонтано хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 125 mg/kg.....	57

4.6.8. Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока изолованог срца хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 250 mg/kg	59
4.6.9. Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока изолованог срца хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 500 mg/kg	61
4.6.10. Поређење ефеката растућих доза екстракта сремуша на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца спонтано хипертензивних пацова	64
4.7. Утицај екстракта сремуша на маркере оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента	66
4.7.1. Вредности маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента нетретираних здравих и хипертензивних пацова	66
Табела 14. Вредности маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента код нетретираних здравих и хипертензивних пацова	66
4.7.2. Вредности маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента здравих пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 125 mg/kg.....	67
Табела 25. Вредности маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента код пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 125 mg/kg.....	68
4.7.3. Вредности маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента здравих пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 250 mg/kg.....	69
Табела 26. Вредности маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента код пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 250 mg/kg.....	69
4.7.4. Вредности маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента здравих пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 500 mg/kg.....	70
Табела 27. Вредности маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента код пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 500 mg/kg.....	71
4.7.5. Поређење ефеката растућих доза екстракта сремуша на маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента здравих пацова.....	72
4.7.6. Вредности маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента спонтано хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 125 mg/kg	73
Табела 29. Вредности маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента код хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 125 mg/kg	74
4.7.7. Вредности маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента спонтано хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 250 mg/kg	75
Табела 30. Вредности маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента код хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 250 mg/kg	75
4.7.8. Вредности маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента спонтано хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 500 mg/kg	76
4.7.9. Поређење ефеката растућих доза екстракта сремуша на маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента спонтано хипертензивних пацова.....	78
4.8. Ефекти екстракта сремуша на морфологију органа пацова	79
4.8.1. Ефекти екстракта сремуша на морфологију бубрега пацова	79
4.8.2. Ефекти екстракта сремуша на морфологију јетре пацова	81
4.8.3. Ефекти екстракта сремуша на морфологију срца пацова након И-Р повреде.....	83

5. Дискусија.....	86
5.1. Утицај примењених растварача на хемијски састав екстракта сремуша и способност неурализације DPPH радикала	87
5.2. Утицај примењених растварача на антимикумно деловање сремуша	88
5.3. Утицај екстракта сремуша на инфламацију шапе пацова	89
5.4. Утицај екстракта сремуша на маркере оксидационог стреса у крви пацова	91
5.4.1. Утицај екстракта сремуша на маркере оксидационог стреса у крви здравих пацова. 91	
5.4.2. Утицај екстракта сремуша на маркере оксидационог стреса у крви спонтано хипертензивних пацова.....	93
5.5. Ефекти екстракта сремуша на И-Р повреду изолованог срца пацова	94
5.5.1. Ефекти екстракта сремуша на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца здравих пацова након И-Р.....	95
5.5.2. Ефекти екстракта сремуша на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца хипертензивних пацова након И-Р.....	97
5.5.3. Ефекти екстракта сремуша на срчани редокс статус код здравих пацова након И-Р. 98	
5.5.4. Ефекти екстракта сремуша на срчани редокс статус код хипертензивних пацова након И-Р	99
5.6. Ефекти екстракта сремуша на морфологију органа пацова	100
5.6.1. Ефекти екстракта сремуша на морфологију бубрега пацова	100
5.6.2. Ефекти екстракта сремуша на морфологију јетре пацова	101
5.6.3. Ефекти екстракта сремуша на морфологију срца пацова.....	101
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	103
7. ЛИТЕРАТУРА.....	105

1. УВОД

1.1 Основне карактеристике сремуша

Сремуш (*Allium ursinum*) представља вишегодишњу зељасту биљку из породице *Alliaceae* која се вековима користи како у исхрани тако и у медицинске сврхе (1). *Allium* род представља највећи и најважнији род из фамилије *Alliaceae* и обухвата више од 800 различитих врста. Интересовање за биљне врсте из овог рода проистиче из њихове употребе у превенцији и терапији различитих болести, као и додатака исхрани. Најновија класификација истиче да се у оквиру рода *Allium* налази 15 подродова и 72 секције (2-6). У оквиру описаног рода по медицинском и нутритивном значају истичу се следеће биљне врсте: бели лук (*Allium sativum*), црни (*Allium cepa*), дивљи лук (*Allium ursinum*) и празиљук (*Allium ampeloprasum*) (6, 7).

1.1.1 Етимологија

Назив врсте потиче од латинске речи "*ursus*" што значи медвед, јер у народу постоји веровање да медведи након буђења из зимског сна поједу сремуш да би прочистили свој организам и повратили енергију и снагу коју су изгубили током сна (7, 8).

1.1.2. Опис и таксономија сремуша

Сремуш достиже висину и до 40 cm, његова стабљика је усправна и тространа. Бели цветови који су груписани у вишецветне штитасте цвасти и луковица дужине не веће од 6 cm су такође значајна одлика ове биљне врсте. Биљка развија два до три листа са дршком, а округло семе црвене боје се налази у чаури. Сремуш је по спољашњем изгледу сличан ђурђевку или мразовцу па треба водити рачуна приликом сакупљања да, не дође до замене једне биљне врсте другом. Оно што разликује и издваја сремуш је карактеристичан мирис на бели лук, што је и главна одлика фамилије у коју се убраја. Сремуш активно расте у периоду до четири месеца, а почетак раста је најчешће почетком године, крајем фебруара и током прве половине марта (7, 9-11).

Табела 1. Таксономске категорије сремуша

Таксономске категорије	Таксони
Царство	<i>Plantae</i>
Раздео	<i>Magnoliophyta</i>
Класа	<i>Liliopsida</i>
Ред	<i>Asparagales</i>
Фамилија	<i>Alliaceae</i>
Род	<i>Allium</i>
Врста	<i>Allium ursium</i>

1.1.3. Распрострањеност сремуша

Сремуш је широко распрострањен на територији Европе и Азије. На територији Србије присутан је као аутохтона врста. Његов раст је онемогућен на великим надморским висинама (изнад 1900 метара), као и на крајњем северу.

Најзаступљенији је у буковим и храстовим шумама где покрива велике површине, као и у пределима са хумусним земљиштем са врло мало или без других биљних врста у том подручју. Више је распрострањена на територији западне Европе, док се идући ка источној Европи сремуш ређе налази. Разлог је то што је континентални утицај израженији.

Разликују се две подврсте *A. ursinum subsp. ursinum* која се налази у западној и централној Европи и *A. ursinum subsp. ucrainicum* која је распрострањена у источној и југоисточној Европи. Иако је реч о подземној врсти сремуш захтева доста светла током првих пар недеља док траје сезона раста. С друге стране, присуство високе концентрације алуминијума у земљишту може ограничити раст сремуша и значајно успорити развој корена. Такође сремуш је доминантна врста због састојака луковике који инхибирају раст других биљака, као и присуства фенолних токсина које ствара у земљишту (12-14).

1.2. Хемијски састав сремуша

Сматра се да је хемијски састав сремуша веома комплексан и различитим методама је забележено присуство око 100 једињења. Биолошки активна једињења која су у највећој мери заслужна за здравствене бенефите су: органосумпорна једињења и полифеноли. Протективно деловање које остварује сремуш повезано је са количином и врстом присутних сумпорних једињења. Најважнији састојци који су уједно одговорни за карактеристичан укус и мирис сремуша су алицин и ајоен који су важни за испољавање лековитог деловања (12, 15-17). Поред сумпортних једињења, терапијски ефекат сремуша може се приписати и присуству полифенолних једињења, којима између осталог припадају танини, флавоноиди и фенолне киселине (10).

1.2.1 Сумпорна једињења сремуша

Специфичан мирис готово свих *Allium* врста потиче од сумпорних једињења, а поред тога битно је напоменути да је сумпор главни хранљиви састојак за све организме. Биљне врсте имају висок биодиверзитет у уносу, метаболизму и акумулацији сумпора. Сумпорна једињења се истичу као најважнији конситуенси сремуша, поготово са аспекта постизања терапијског деловања (16, 17). Анализе хемијског састава указују да се садржај и количина сумпорних једињења могу значајно разликовати у зависности од биљног органа, фазе онтогенетског развоја биљке, као и услова чувања (температура, светлост, влажност ваздуха). Када се говори о важним једињењима у сремушу, не смеју се заборавити ни глутамил пептиди и неиспарљива једињења без мириса, сулфоксиди.

Хидролизом сулфоксида настају секундарна, испарљива сумпорна једињења, као што су тиосулфинати и полисулфиди (8, 16, 18). Поред наведених, доказано је присуство и следећих цистеин сулфоксида у сремушу:

- метин ((+)-*S*-метил-1-цистеин-сулфоксид),
- алин ((+)-*S*-2-пропенил-1-цистеин-сулфоксид),
- изоалин ((+)-*S*-(1-пропенил)-1-цистеин-сулфоксид),
- пропин ((+)-*S*-пропил-1-цистеин-сулфоксид) и
- етин (*S*-етил-цистеин-сулфоксид) (14).

Пошто су метин и алин доминантно заступљени, сматра се да сремуш припада метин/алин типу. С друге стране, изоалин и пропин су присутни само у траговима и то

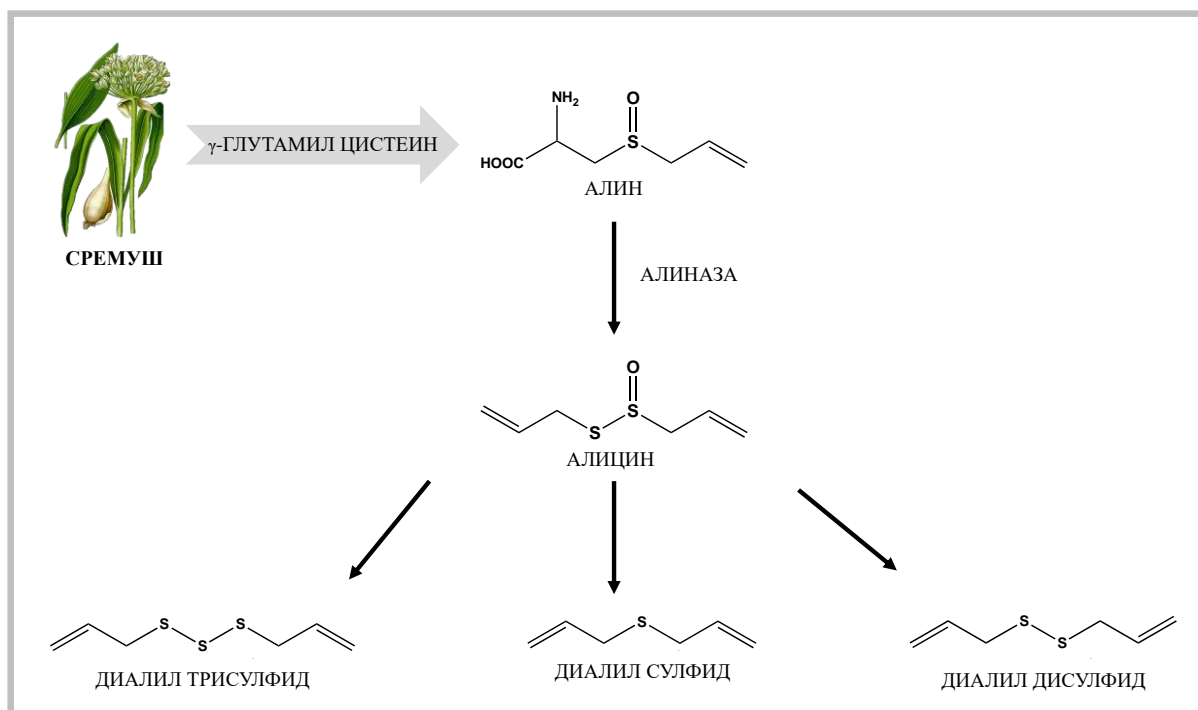
једино у листу и луковици, док се етин у највећој мери може наћи у свежим листовима сремуша (11, 19). Сулфоксиди су подложни хидролизи, при чему настају тиосулфинати који су реактивна и нестабилна једињења, подложна спонтаним хемијским реакцијама. Услед њихове разградње настаје широки спектар сумпорних једињења који не губе биолошка својства, а учествују у даљим трансформацијама (20). Важно је нагласити да се због њихове топлотне нестабилности, главни биолошки активни тиосулфинати уништавају у процесу припреме хране, што је уједно и највећа мана ове биљне врсте (20).

1.2.1.1 Алин

Алин је једно од кључних сумпорних једињења растворних у води. Показује значајна антибактеријска и антиканцерогена својства, као и потенцијал да снизи ниво глукозе који је упоредив са оралним хипогликемиком, глибенкламидом (21, 22). Након оштећења биљног ткива (сечењем, жвакањем...) сремуша, ензимском реакцијом из алина настаје алицин. Односно, хидролизом алина долази до стварања дехидроаланина и алил сулфенске киселине, а након тога се два молекула алил сулфенске киселине спонтано кондензују у један молекул алицина (22).

1.2.1.2 Алицин

Алицин је одговоран за типичан мирис и укус свеже сеченог или згњеченог сремуша (18, 23). По хемијском саставу алицин се убраја у тиоестре сулфенске киселине и његова структура одређена је крајем 40-их година прошлог века. Алицин је благо жућкаста, уљана течност, која се одликује широким спектром деловања у терапији различитих стања. Протективни ефекти алицина превасходно се везују за терапију кардиоваскуларних обољења, тумора, али и многих других хроничних болести. Алицин је јако реактиван и термолабилан, али у воденим растворима на -70 °C може да се чува и више деценија (22). Битна карактеристика овог молекула је да поседује хидрофобна својства што му омогућава једноставан пролазак кроз ћелијску мембрану, при чему може да испољи фармаколошке ефекте (24). Алицин је веома осетљив на топлоту и светлост и једноставно и брзо се метаболише до полисулфидних једињења, попут диалил суфида (DAS), диалил дисулфида (DADS) и диалил трисулфида (DATS). DAS, DADS и DATS су веома значајни за бројне протективне ефекте које сремуш постиже у терапији бројних обољења (25, 26).



Слика 1. Разградња алина и грађење DAS, DADS и DATS

1.2.1.3 Диалил сулфид (DAS)

DAS је једно од једињења сумпора које је одговорно за специфичан укус и мириш сремуша. Наведено једињење подложно је оксидацији на атому сумпора, при чему настају производи диалил сулфоксид и диалил сулфон, који се даље претварају у епоксидне интермедијере. У бројним експерименталним студијама доказано је да DAS показује здравствене бенефите у терапији канцера, бактеријских инфекција, дијабетеса, атеросклерозе и других обољења (27, 28).

1.2.1.4 Диалил дисулфид (DADS)

DADS се истиче као једно од главних органосумпорних једињења сремуша. Главна предност овог једињења је што доводи до редокс стреса у ћелијама тумора и узрокује апоптозу, а притом не утиче на здраве ћелије. Такође је у студијама доказан и његов антиоксидациони потенцијал и антимикуробна активност, а постоје и докази на хуманој популацији и анималним моделима да DADS показује ефикасност у терапији различитих туморских обољења (29-31).

1.2.1.5 Диалил трисулфид (DATS)

Бројни извештаји о овом стабилном и веома ефикасном полисулфидном једињењу сведоче о његовом хипогликемијском потенцијалу и великом потенцијалу у контроли дијабетеса. Такође, потврђен је и антиканцерогени ефекат код пацијенткиња са карциномом дојке који се базира на измени метаболизма канцерогених ћелија и застављању ћелијског циклуса (32, 33).

1.2.1.6 Утицај различитих фактора на садржај сумпорних једињења у сремушу

На садржај сумпорних једињења у сремушу и екстракту сремуша утичу бројни фактори, као што су период сакупљања биљке, станиште, метода и услови екстракције. На пример, претходно спроведена студија показала је како различито време сакупљања сремуша утиче на садржај цистеин сулфоксида у различитим деловима сремуша. Наиме, у почецима вегетације, у марту месецу, луковица сремуша је садржала доста метина и алина. С друге стране, у наредним недељама од марта до јуна може да се детектује виша концентрација алина, док ниво метина опада. Након 2 месеца од почетка вегетације уочена је слична количина алина и метина као и на почетку, тј. у марту. Интересантно је да је садржај изоалина и пропина био релативно константан током читавог посматраног периода, и износио око 10% за изоалин и мање од 5% за пропин. Такође, у наведеном истраживању пратили су утицај времена сакупљања биљке на садржај цистеин сулфоксида у листу сремуша. Уочено је да се у периоду од марта до јуна ниво метина смањивао док је ниво алина скоро дупло порастао. Додатно, садржај изоалина је порастао након одређеног временског периода (19).

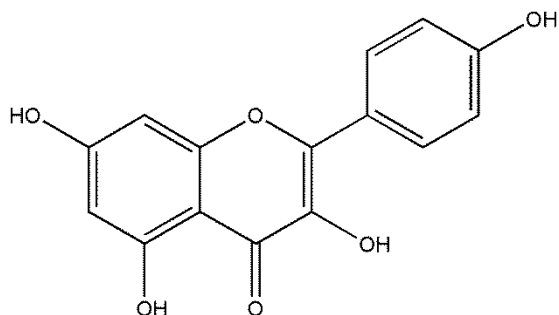
Према подацима из литературе, органосумпорна једињења и неиспарљиви цистеин сулфоксиди су термолабилна једињења која се под утицајем топлоте могу разградити. Резултати претходних студија показали су да је продужењем термичке обраде на 20 или 30 минута смањена концентрација алил полисулфида (14). Извештаји указују на то да након излагања белог лука или сремуша термичком третману долази до смањења садржаја сумпорних једињења (34). На пример, у бланшираном белом луку садржај тиосулфината значајно се смањује са повећањем времена обраде и температуре. Познавање утицаја температуре на садржај активних принципа сремуша и белог лука је од великог значаја како би се одабрао унос оног облика који садржи најоптималнија лековита својства.

1.2.2 Фенолна једнињења сремуша

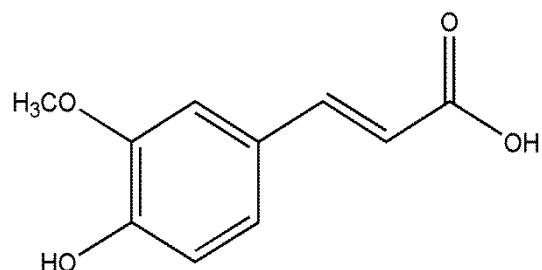
Поред једињења сумпора, за терапијско деловање сремуша одговорна је и значајна количина фенолних једињења. До сада је показано да се у јестивим биљним врстама налази више стотина полифенолних једињења која доприносе не само лековитим својствима биљке, већ су одговорна и за укус, горчину, боју, мирис. Генерално, за фенолна једињења карактеристично је да садрже макар један ароматични прстен за који су везане једна или више хидроксилних група. У биљкама се јављају у форми агликозида или гликозида, тј. везани са једном или више шећерних компоненти што повећава њихову растворљивост у води (35, 36).

Полифеноли се према хемијској структури могу разврстати у следеће класе: фенолне киселине, флавоноиди, стилбени и лигнани. У оквиру групе флавоноида на основу броја двоструких веза, броја и положаја супституената са кисеоником разликују се: флавоноли, флаволи, изофлаволи, флаванони, антоцијани и флаваноли (35).

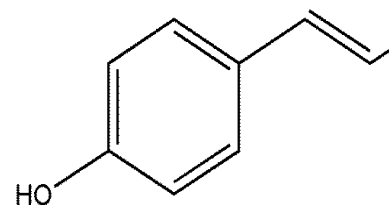
Флавоноиди и фенолне киселине представљају најбројнију класу полифенола у врстама из породице лукова. У оквиру флавоноида истичу се флавоноли и антоцијани, с тим што су антоцијани карактеристични за црвене лукове. Садржај флавонола у врстама из породице *Allium* налази се у опсегу од 7-1917 mg/kg свеже масе. Сматра се да је у биљним врстама породице *Allium* идентификовано око 52 једињења из групе флавонола међу којима су најбројнији кверцетин, кемпферол, изорамнетин и мирицетин.



Кемпферол



Ферулинска киселина



p-кумаринска киселина

Слика 2. Структуре истакнутих полифенола у сремушу

Анализом хемијског састава сремуша уочава се да су најбројнији флавоноиди деривати кемпферола. Наиме, студија која је испитивала етанолни екстракт листа сремуша укаала је на присуство следећих једињења: кемпферол 3-О-бета-неохесперидозид-7-О-[2-О-(транс-р-кумароил)]-бета-D-глукопиранозид, кемпферол 3-О-бета-неохесперидозид-7-О-[2-О-(транс-ферулоил)]-бета-D-глукопиранозид, кемпферол 3-О-бета-неохесперидозид-7-О-[2-О-(транс-р-кумароил)-3-О-бета-D-глукопиранозил]-бета-D-глукопиранозид, кемпферол 3-О-бета-глукопиранозид и кемпферол 3-О-бета-неохесперидозид (37). Такође, испитиван је хемијски састав екстракта сремуша добијеног из свежих листова који су осушени смрзавањем. Поред претходно описаних једињења уочено је додатно присуство следећих једињења: 3-О-бета-D-глукопиранозид, 3-О-бета-D-глукопиранозил-7-О-бета-D-глукопиранозид, 3-О-алфа-L-рамнопиранозил-(1→2)-[3-ацетил]-бета-D-глукопиранози и 3-О-алфа-L-

рамнопиранозил-(1→2)-[6-ацетил]-бета-D-глукопиранозид (38). Такође, у свежим цветовима сремуша откривено је присуство тимидина, аденозина, астрагалина (кемпферол-3-O-бета-D-глукопиранозид), кемпферол-3-O-бета-D-глукопиранозил-7-O-бета-D-глукопиранозид, кемпферол-3-O-бета-D-неосферозид и кемпферол-3-O-бета-D-неосферозид-7-O-beta-D-глукопиранозид (17).

1.2.2.1 Утицај различитих фактора на садржај полифенола у сремушу

Литературни подаци указују на то да на концентрацију екстрахованих фенола из сремуша утиче примењена метода екстракције, растварач као и део биљке који се екстрахује. Такође, на хемијски састав биљног екстракта утиче и станиште саме биљке, клима где расте, време сакупљања. Разлике у садржају полифенола сремуша откривене су испитивањем екотипова прикупљених из различитих области у Пољској (39). Показано је да је сремуш са места *Roztocze* садржавао највишу количину флавоноида и најмањи садржај фенолних киселина, док је највећи садржај фенолних киселина откривен у листовима екотипа *Dukla*. Претходна студија је истакла да је укупни садржај полифенола био већи у екстракту добијеном из листа када је примењена техника мацерације уз коришћење 70% етанола као растварача у односу на екстракцију ултразвуком (40). Такође, испитиване су разлике у фенолним фракцијама између закисељених метанолних екстраката зелених и жутих листова, стабљике и семене сремуша. Показано је да је садржај деривата кемпферола и једињења ацилованих р-кумаринском киселином био највећи у жутих листовима, па затим у зеленом лишћу. Генерално посматрано, семе садржи минималну количину фенолних једињења, међутим више неацилованих у поређењу са ацилованим флавоноидним гликозидима са једињењима р-кумаринске киселине пронађено је у стабљикама и семену у поређењу са листовима (41).

Група истраживача проучавала је и утицај дела биљке на садржај фенола и откривено је да је укупни садржај полифенола мањи у луковници у односу на листове. С друге стране, садржај везаних фенола био је сличан у луковници и листовима (42). Гална киселина је важан састојак сремуша и показано је да је њена концентрација највећа када се за добијање екстракта сремуша користи 96% метанол, нешто мања када се користи 80% метанол и најмања код примене 96% етанола (43). Потенцијалне разлике у количини фенола које су пронашли различити аутори могу бити последица примене различитих метода за квантификацију.

Такође, екоципови сремуша са различитих станишта у Пољској показују разлике у расту и цветању. На пример, најдуже листове формирао је екотип *Ducla*, док је најспорији раст лишћа забележен у случају екотипа *Roztocze*. Екотип карактерише најшири листни лист, најдуже стабљике и цветне стабљике, као и највећи пречник цвасти. Екотип *Bieszczady* имао је највећи број цветова у цвасти, док је екотип *Ducla* формирао најкраће цветне стабљике са најмање цветова у цвасти (44).

1.2.3 Стероидни гликозиди

Показано је да у састав сремуша улазе и стероидни гликозиди (44). Из луковице и листа сремуша изолована су следећа једињења: диосгенин 3-O- α -L-рамнопиранозил-

(1→4)- α -L-рамнопиранозил-(1→4)-[α -L-рамнопиранозил-(1→2)]- β -D-глукопиранозид и (25R)-спирост-5,25(27)-диен-3 β -ол3-O- α -L-рамнопиранозил-(1→4)- α -L-рамнопиранозил-(1→4)-[α -L-рамнопиранозил-(1→2)]- β -D-глукопиранозид.

Такође у подземном делу сремуша откривено је присуство и прегнанског гликозида као што је 3-хидрокси-прегна-5,16-диен-20-он3-O- α -L-рамнопиранозил-(1→4)- α -L-рамнопиранозил-(1→4)-[α -L-рамнопиранозил-(1→2)]- β -D-глукопиранозид.

1.2.4. Остала једињења која улазе у састав сремуша

Главне биолошки активне супстанце у сремушу одговорне за ефекте на одржавање здравља су несумњиво сумпор и фенолна једињења. Међутим, у овој биљци присутни су и други хемијски састојци: лектини, полисахариди, масне киселине (палмитинска, линолна, олеинска, палмитолеинска, стеаринска, α -линоленска и миристинска киселина), многе аминокиселине (аспарагин, глутамин, аспарагинска киселина, глутаминска киселина, аргинин, аланин, глицин, треонин), пигменти итд (8, 45). Једињења која су спечифична за сремуш а одуствна у осталим *Allium* врстама су галакто липидни деривати: β -ситостерол 3-O- β -D-глукопиранозид и 1,2-ди-O- α -линоленоил-3-O- β -D-галактопиранозил-sn- глицерол (46).

1.2.5. Етарско уље сремуша

Испитивања су показала да се мала количина, око 0,07%, етарског уља може добити из сремуша. Период сакупљања биљке одражава се на хемијски састав етарског уља. Доминанта једињења су сумпорна и то диалил дисулфиди, диалил трисулфиди, 1-прпенил алил дисулфид и метил алил трисулфид (8,47, 48).

1.3. Значај сремуша

1.3.1. Улога сремуша у нутрицији

Све је веће интересовање за употребу биљака и биљних препарата као функционалних састојака и у фармацеутским и у прехранбеним производима (8, 16). Сремуш се вековима примењује како у исхрани (зачин, салата), тако и као лековити агенс. Исхрана заузима важну улогу у развоју или превенцији различитих хроничних болести и показано је да одговарајуће навике у исхрани директно могу утицати на здравље људи. Још давних дана Хипократ је изјавио „Нека храна буде ваш лек, а лек ваша храна“. Када се развила модерна медицина овај концепт замењен је применом лекова, међутим већ у 19. веку опет се истиче значај адекватне исхране у јачању организма (49). Последњих година научници су окренути ка конзумацији биљака које остварују бројне благодети, али од посебне важности је утврдити тачан модел исхране који би био најфикаснији у контролни болести. Како би се уврстиле у функционалну храну, здравствени бенефити биљака морају бити тестирани у клиничким испитивањима у циљу потврде ефикасности. Бели лук на пример још увек није потпуности испитан, али резултати бројних студија указују на његову протективну улогу у терапији бројних болести. Најбитније биљке из породице *Allium*, бели лук и сремуш могу имати велики значај у нутрицији јер садрже сумпорна и фенолна једињења са импозантним терапијским потенцијалом (49, 50).

1.3.2. Лековита својства сремуша

Бројни извештаји сведоче о томе да се сремуш интензивно користи широм света у лечењу многих болести и стања чак и од периода мезолита. Сви делови биљке су јестиви у сировом и куваном облику и постају све популарнији у локалним кухињама широм Европе. Листови се могу користити као салата, зачин или у куваном облику. Лековита својства сремуша приписује се лишћу и луковима, које се најчешће користе у традиционалној медицини (41, 51). Користи се свежи надземни део биљке (*Allii ursini herba recens*) или свежа луковица (*Allii ursini bulbus recens*). Надземни део се бере у пролеће пре него што започне цветање биљке, док се луковица бере у августу, пре него што семе сазри. Убрале луковице могу да се чувају неколико дана на сувом и хладном месту.

1.3.2.1 Ефекти сремуша на дијабетес

Литературни подаци указују на потенцијал сремуша у лечењу дијабетеса. Претходна студија испитивала је ефекат примене сремуша у комбинацији са стандардном храном у периоду од 2 месеца на моделу дијабетичних пацова и показано да ова биљна врста доводи до снижења вредности глукозе и LDL (52). Додатно, утицај конзумације сремуша испитиван је и код спонтано хипертензивних пацова (SHR) и упоређиван са ефектима примене белог лука током 45 дана. Примена белог и медвеђег лука довела је до скока у нивоу циркулишућег инсулина указујући на протективне ефекте у терапији дијабетеса.

Бројне студије су потврдиле ефикасност примене врста рода *Allium* на гликорегулацију која се приписује присуству различитих биоактивних једињења. Сматра се да овом ефекту доприносе флавоноли који могу да инхибирају ензиме укључене у метаболизам угљених хидрата, ублаже оксидациони стрес и инфламацију као кључне факторе који погоршавају дијабетес. Такође, флавоноли могу измеити инсулинску сигналну трансдукцију и деловати инхибиторно на цревни натријум глукозни транспортер 1 (SGLT1). Поред флавонола, сматра се да сумпорна једињења сремуша значајно доприносе контроли дијабетеса и да синергистички ефекат наведених једињења учествује у регулацији глукозе и превенцији компликација изазваних дијабетесом. Ефекти белог и медвеђег лука у дијабетесу показани су на анималним моделима дијабетеса изазваног стрептозотоцином и алоксоном, као и на пацијентима са дијабетесом. Из групе сумпорних једињења истичу се алицин и донори водоник сулфида (H_2S) као што је DATS. Бенефит донора H_2S заснива се на чињеници да развој дијабетеса доводи до повећања H_2S , који може инхибирати секрецију инсулина и смањити преоптерећење дијабетичних бета ћелија смањењем садржаја АТФ. Самим тим, додатак агенаса који ослобађају овај гасни трансмитер може бити важан у смањењу штетних последица дијабетеса (53).

1.3.2.2. Антикancerогени ефекти сремуша

Истраживања су показала да унос биљних врста из рода *Allium* може смањити ризик од настанка карцинома дојке, дебелог црева, панкреаса, простате, езофагуса. Механизми одговорни за постизање антитуморског ефекта сремуша и даље нису темељно испитани, али се сматра да сремуш доводи до смањења стварања продуката ДНК, инхибиције пролиферације и апоптозе малигних ћелија (54). Антитуморски потенцијал везује се за органосумпорна једињења, нарочито DADS, DATS итд који

настају разградњом алицина. На моделу пацова уочено је да унос DADS-а може да супримира развој хемијски изазваног канцера колона (55). Вишеструки докази указују на то да механизам путем ког органосумпорна једињења лука могу инхибирати раст туморских ћелија подразумева повећање експресије ензима задужених за детоксификацију као што су глутатион трансфераза. Такође, ова једињења могу инхибирати цитохром P450-зависну монооксигеназу (56). Позитивни ефекти DADS-а огледају се не само у потенцијалу да инхибира туморске ћелије, већ у чињеници да не изазива нежељене ефекте (57). Постоји податак о смањеном ризику од развоја канцера простате код мушкараца који су конзумирали биљне врсте из рода *Allium* (58).

1.3.2.3. Антиатерогени ефекти сремуша

Доступни извештаји сугеришу да се сремуш користи у Универзитетској болници у Букурешту у Румунији због антиатерогеног деловања (59). На моделу SHR пацова откривен је протективан утицај хроничне конзумације сремуша на липидни статус (16). Једињења која могу да инхибирају синтезу холестерола су ајоени, метил ајоени, алицин, DADS итд (15). Такође, резултати студије која је пратила утицај уноса сремуша током 8 недеља код зечева са хиперхолестеролемијом показали су капацитет да превенира и лечи атеросклеротске поремећаје (60). Улога сремуша у контроли хиперхолестеролемије може бити од великог значаја јер дислипидемија може оштетити функције коронарног ендотела и умањити капацитет за неутрализацију слободних радикала (61).

1.3.2.4. Антиагрегациони ефекти сремуша

Доказан је и антиагрегациони ефекат ове биљне врсте који се заснива на инхибицији АДП-а што је од изузетног значаја код кардиоваскуларних пацијената (62). Једињења која доприносе антиагрегационом ефекту сремуша су галакто липидни деривати: β -ситостерол 3-O- β -D-глукопиранозид и 1,2-ди-O- α -линоленоил-3-O- β -D-галактопиранозил-sn- глицерол (60). Иако су углавном фармаколошки ефекти сремуша упоредиви са белим луком, у појединим болестима сремуш је супериорнији. Сматра се да томе доприносе управо фитостероли и галактолипидни деривати којих нема у другим врстама лукова.

1.3.2.5. Хипотензивни ефекти сремуша

Студије су показале да конзумација сремуша може да смањи систолни крвни притисак хипертензивних пацова. Када су упоређивана два препарата сремуша, са мањом и већом концентрацијом алицина уочено је да виша конценетрација алицина доприноси већој редукцији крвног притиска (63). У овом истраживању показано је да је ниво циркулишућег ангиотензина II значајно нижи код пацова који су били на исхрани обогаћеној сремушем. Претпоставља се да је механизам одговоран за хипотензивни ефекат ове биљне врсте повезан са утицајем на ренин-ангиотензин алдостерон систем (РААС). Још пре око 3 деценије уочено је да примена воденог екстракта листа сремуша може да инхибира активност ангиотензин конвертујућег ензима (АЦЕ) (64). Такође, АЦЕ активност била је знатно снижена код пацова на третману сремушем у односу на пацове који нису конзумирали ову биљку (65). Поред

утицаја на РААС сматра се да снижењу тензије доприноси и утицај на азот моноксид (NO) (64).

1.3.2.6. Кардиопротективи ефекти сремуша

Вековима се сремуш користи у традиционалној медицини у превенцији бројних срчаних обољења, а поједини протективни ефекти на срце потврђени су и у експерименталним студијама. Поред претходно описаних бенефита сремуша на кардиоваскуларни систем као што су хипотензивни, хиполипидемијски, антиагрегациони ефекат, постоје докази да сремуш може ублажити исхемијско-реперфузиону (И-Р) повреду срца (65). Такође, још једна група аутора показала је да сремуш побољшава функцију срца што је потврђено побољшаним ехокардиографским налазом и унапређеном функцијом изолованог срца (66).

1.3.2.7. Антиоксидациони ефекти сремуша

Литературни подаци указују на то да сремуш испољава антиоксидациона својства захваљујући присуству флавоноида и каротеноида. Претходне студије истакле су капацитет сремуша да неутралише поједине радикалске врсте што је потврђено *in vitro* тестовима. Такође, извештаји указују на то да састојци етарског уља сремуша могу испољити бенефите у санирању штетних ефеката слободних радикала (8). Међутим, како би се расветлила улога ове биљне врсте у модулацији редокс равнотеже код акутних и хроничних болести неопходно је спровести испитивања на животињама или клиничке студије. Третман екстрактом сремуша код животиња и људи са различитим хроничним патологијама могао би да укаже на потенцијал ове биљне врсте да се уврсти као антиоксиданс у профилакси и лечењу људи.

1.3.2.8. Антимикробни ефекти сремуша

Бројне студије иду у прилог томе да се сремуш може користити у сврху антимикробног деловања. Начин примене подразумева и спољашњу апликацију као и перорални унос ове биљне врсте. Раније је показано да екстракти добијени из листова и цветова сремуша делују антибактеријски и антигљивично. Ефекат је интензивнији на Грам-позитивне бактерије, а нешто слабији на Грам-негативне (67, 68). Главна биоактивна једињења заслужна за антимикробни ефекат ове биљне врсте су сулфиди, а нарочито алицин. Извештаји о антимикробном ефекту алицина датирају још од пре неколико деценија (69). Различит интензитет антимикробне активности очекује се применом различитих делова биљке, а цвет се показао потентнијим у односу на лист сремуша вероватно јер садржи већу количину биоактивних једињења са антимикробним потенцијалом. Показано је и да сок од луковице испољава инхибиторне ефекте на бактерије, гљиве и паразите. Ефекти екстракта сремуша у терапији бактеријских и гљивичних инфекција директно зависе од примењене методе екстракције као и коришћеног растварача. Метанол се истиче као погодан растварач за екстракцију бројних антимикробних једињења сремуша, па би метанолни екстракт био делотворан против бројних Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија. У табели је дат приказ микроорганизама за које је претходним истраживањима показано да могу бити санирани применом сремуша.

Табела 2. Приказ бактерија и гљива против којих је делотворан сремуш

Бактерије	Гљиве
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Cladosporium spp</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Rhizopus nigricans</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Geotrichum candidum</i>
<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>

1.3.2.9. Антиинфламацијски и имуномодулаторни ефекти сремуша

Утицај једињења из сремуша и белог лука на ублажавање инфламације документован је раније. Претходно спроведена студија указује на потенцијал екстракта листа и цвета сремуша да испољи антиинфламацијско деловање. Експеримент је спроведен на моделу инфламације код пацова, а предложени механизам подразумева инхибицију фагоцитозе путем смањења оксидационог стреса (70). Поједине компоненте белог лука и сремуша могу да имају имуномодулаторне ефекте који, бар делимично, делују кроз промене у производњи различитих цитокина. Док је за бели лук потврђено да делује као одличан превентивни и протективни агенс у инфламаторним патологијама, за сремуш су и даље потребна додатна испитивања. Међутим, на основу сличног хемијског састава са белим луком и претходно спроведених истраживања може се очекивати да сремуш испољи бенефите у стањима праћеним израженом инфламацијом (71, 72).

1.4. Коронарна болест срца

Кардиоваскуларне болести (КВБ) представљају водећи узрок морбидитета и смртности у целом свету. У КВБ превасходно се убрајају: коронарна болест срца (КБС) или исхемијска болест срца (ИБС), коронарна болест артерија, акутни коронарни синдром и многе друге (73, 74). Акутни инфаркт миокарда (АИМ) представља најозбиљнију компликацију ИБС, која је често праћена смртним исходом, па су стога велики напори уложени у проналазак оптималног терапијског приступа који би помогао у лечењу или пак излечењу ових пацијената. Непосредно након постављања дијагнозе АИМ веома је значајно поновно успоставити реперфузију. Овај маневр се постиже примарном перкутаном коронарном интервенцијом и фибринолизом.

Током АИМ коронарни проток крви кроз артерије постаје сужен или заустављен, док срчаном ткиву недостају кисеоник и хранљиве материје. Веома је битно да се реперфузија успостави у првих пар минута јер смањен доток кисеоника до срца резултира смањењем слободне енергије изведене из АТП-а изнад критичног нивоа. Иако је рана реперфузија од важности у циљу спашавања миокарда, повратак кисеоника у исхемијско ткиво парадоксално може још више оштетити срце. Управо због тога, оштећења миокарда која настају током исхемије и у првим минутима реперфузије називају се И-Р повреда. Пре око шест деценија научници су запазили да реперфузија може узроковати парадоксалну дисфункцију кардиомиоцита и додатно

оштетити ткиво узроковано хипоксичним стресом. Такође, повратак дотока крви у срце може довести до развоја вентрикуларних аритмија које могу бити смртоносне.

Како би се приступило развоју најефикасније стратегије у превенцији и третману И-Р повреде од великог значаја је разумети патофизиолошке догађаје који су одговорни за њен настанак. Наиме, када је смањен доток кисеоника у исхемији омета се рад електрон транспортног ланца у митохондријама и редукује главни енергетски супстрат аденозин трифосфата (АТФ). Смањено стварање АТФ-а и енергетско снабдевање срчаног мишића доводе до изражених последица на миокарду (73, 74).

Током исхемије миокарда доминира анаеробни метаболизам и долази до пада у вредности рН. Током тог периода Na^+/H^+ јоно-измењивачка пумпа се активира да би се H^+ уклонили и долази до интрацелуларног инфлуksа Na^+ . Услед пада АТФ-а, јони Ca^{2+} из ендоплазматског ретикулума се мање преузима и долази до нагомилавања Ca^{2+} у цитосолу што омета контракцију и релаксацију, а самим тим и рад миокарда. Велики проблем представља и то што се митохондријалне транзиционе пора (МТП) отварају при чему долази до неконтролисаних контракција миокарда, при чему се на хистолошким налазима уочавају контракционе пруге. Током исхемијске повреде долази до функционалних, али и бројних морфолошких и биохемијских промена које могу узроковати слабљење миокарда које се уочава кроз пад контракција, систолног и дијастолног притиска срца. Степен оштећења миокарда се експоненцијално повећава са продужетком трајања исхемије и одлагањем успостављања реперфузије.

Наиме, бројни фактори доприносе развоју и прогресији И-Р повреде, а међу њима се издваја: повећана продукција реактивних кисеоничних врста (енгл. *reactive oxygen species*- ROS), отварање МТП, преоптрећење јонима Ca^{2+} и појачан запаљенски одговор. Повећано отварање МТП у реперфузији ослобађа цитохром С и узрокује смрт кардиомиоцита. До сада је добро познатио да оксидациони стрес и инфламација значајно утичу на функцију и структуру срчаног ткива, али детаљни механизми који доприносе оштећењу срца и даље нису у потпуности разјашњени и захтевају даља проучавања (73, 74).

Хипертензија се сматра једним од главних фактора ризика за ИБС, па је од велике важности успоставити адекватну контролу тензије код ових пацијената (63). Потпуно је очекивано да исход И-Р повреде буде неповољнији код пацијената са повишеним крвним притиском јер долази до одређених неурохуморалних адаптација. Из тог разлога је јако важно одржавати физиолошке вредности крвног притиска, како би се смањио ризик за настанак дубљих оштећења срца (63).

1.4.1. Улога сремуса у прекондиционирању миокарда

Бројне студије су показале да примена појединих фармаколошких агенаса или биљних препарата може повећати толеранцију срца на исхемију индукујући сличну сигнализацију као исхемијско прекондиционирање (73, 74). Доступни литературни подаци говоре о значајним протективним ефектима биљака и једињења изолованих из биљака на срце. Кардиопротективни ефекти хроничне примене биљака/једињења изолованих из биљака углавном се приписују полифенолима за које је у више наврата доказано да поседују значајна антиоксидациона и антиинфламацијска својства. У том смислу бројни научници непрестано покушавају да открију и истраже једињења природног порекла која би имала кардиопротективне ефекте, а самим тим и способност да смање последице И/ Р повреде на функцију миокарда (74).

Документована је висока ефикасност употребе сремуша у превенцији и лечењу болести кардиоваскуларног система, а заснива се на потенцијалу ове биљке да снизи крвни притисак, ниво инсулина, укупног нивоа холестерола и испољи антиагрегационо дејство. Растуће интересовање за употребу ове биљне врсте као дијететског суплемента и хране указује на потребу даљег испитивања њених терапијских користи. Пре више од две деценије показано је да сремуш може ублажити зону исхемије на анималном моделу и деловати протективно на аритмично срце (66). Међутим, према нашем досадашњим сазнањима, улога ове биљне врсте у маневру прекодиционарања срца није довољно позната. Хемијска испитивања сремуша открила су присуство сумпорних и фенолних једињења као најкарактеристичнијих састојака који могу бити ефикасни у постизању кардиопротекције. Поставили смо хипотезу да би употреба екстракта сремуша током 28 дана могла смањити штетне ефекте И-Р повреде на функционална својства срца. Посебна новина ове студије огледа се у праћењу ефеката примене сремуша на срце нормотензивних и хипертензивних пацова у циљу праћења улоге ове биљке и у условима повећања вредности тензије. Такође, акценат је стављен на испитивање потенцијала сремуша да модулира редокс равнотежу и тиме допринесе функционалном опоравку срца након исхемије.

1.5. Инфективне болести

Велики терет за здравствени систем представљају заразне болести које могу бити узроковане бројним патогенима као што су бактерије, вируси, гљиве, паразити. На основу процене Светске здравствене организације главни узроци смртности су инфекције доњих дисајних путева, ХИВ, маларија итд. Иако је окрићем антимикробних лекова учињен невероватан напредак у медицини, главна брига данашњих дана проистиче из развоја резистенције све већег броја бактерија на тренутно доступне лекове. Антимикробна резистенција се дефинише као појава у ком микроорганизми не реагују на лекове који су претходно били ефикасни и као резултат инфекција перзистира и шири се. Појава резистенције на антимикробне лекове утиче на морталитет и повећање трошкова здравствене заштите, а процењује се да сваке године велики број људи у Европи умире директно од бактеријских инфекција отпорних на лекове. Фактори који су допринели проблему резистенције укључују повећану употребу антимикробних лекова и њихово неправилно прописивање (75, 76).

Последњих година расте интересовање за биљне препарате у третману инфекција због њихових бројних предности у односу на синтетске лекове. Интересантно је да се у азијским и афричким земљама велики број становништва ослања се на традиционалну медицину (75). Биљке се налазе у фокусу истраживања као потенцијални извор антимикробних једињења које могу успешно бити искоришћене у санирању бројних инфекција.

1.5.1. Улога сремуша у лечењу инфективних болести

Постоје докази да су органосумпорна једињења која су заступљена у врстама *Allium* ефикасна у лечењу бактеријских и гљивичних инфекција. Документован је и антимикробни потенцијал сремуша, с тим што је ефикаснији у лечењу Грам позитивних у односу на Грам негативне бактерије. Међутим недостатак примене ове биљке огледа се у термалној нестабилности органосумпорних једињења, а такође специфичан укус и мирис ових једињења ограничава њихов чест унос путем исхране (76). Поред органосумпорних једињења, полифеноли из белог и медвеђег лука такође могу

испољити антимикробни ефекат. Показано је и да се антимикробни потенцијал екстракта белог лука може искористити у преради и конзервирању хране. Наиме бели лук може да се користи за убијање патогена који се преносе храном, а откривено је да додатак у месо, месне прерађевине може значајно продужити рок и очувати стабилност прехранбених производа (77). Велики проблем за здравствени систем представља појава биофилма, односно заједнице бактерија уклопљених у матрикс које су саме створиле. Опасност проистиче из чињенице да бактерије у биофилму карактерише измењен фенотип у односу на планктонске микроорганизме. У том смислу, лечење инфекција овог типа је још већи изазов услед учесталије резистенције на лекове (78).

На биолошку активност екстракта утичу примењени растварач и метода екстракције па је кључна дилема пре испитивања ефикасности екстракта и његове имплементације у клиничку праксу одабир оптималних услова екстракције. Иако су антимикробни ефекти сремуша потврђени, информације у овој области су и даље недовољне, а стварни утицај растварача различите поларности на различите микроорганизме и даље није испитан. Из тог разлога, циљ ове студије био је да испита антимикробни потенцијал воденог, метанолног и хлороформског екстракта сремуша и да утврди на који начин промена растварача утиче на терапијски ефекат. Такође, циљ је упоредити хемијски састав екстраката са њиховим оствареним антимикробним деловањем у циљу утврђивања потенцијалних једињења која су одговорна за њихов фармаколошки учинак.

1.6. Инфламација и инфламаторне болести

Инфламација представља одговор имунског система на иритансе попут патогена, страног тела, хемикалије, радијације. Адекватан инфламацијски одговор је од круцијалног значаја за уклањање микроорганизама или других узрочника, међутим проблем настаје када инфламација перзистира и праћена је продуженим ослобађањем цитокина. Један од раних ћелијских догађаја представља инфилтрација полиморфонуклеарних леукоцита, а њихова прекомерна активација може генерисати слободне радикале. Као резултат стварања слободних радикала долази до оксидативног оштећења ткива и нарушавања ћелијске функције (70). Велика пажња научника усмерена је ка инфламацији и потенцијалним стратегијама за њено санирање из разлога што је инфламација присутна у бројним патолошким стањима. Наиме литературни подаци указују на све већу учесталост болести у чијој етиологији лежи инфламација. Бројни подаци сведоче о повезаности инфламацијског одговора и дијабетеса, канцера, кардиоваскуларних болести, гојазности итд (79-81).

Тренутно доступна антиинфламациона терапија обухватаја најчешће нестероидне антиинфламаторне лекове (НСАИЛ) и глукокортикоиде. Иако наведени лекови остварују користан ефекат у ублажавању инфламације, проблем са њиховом применом лежи у појави бројних озбиљних нежељених реакција. Из тог разлога том истраживање и развој лековитих биљака отворили су нову еру у превенцији и лечењу инфламаторних болести (80). Биљке стварају секундарне метаболите који могу испољити сигнификантан антиинфламацијски потенцијал. Предност у односу на синтетске лекове огледа се у бољем безбедносном профилу па је стога од изузетног значаја оријентисати се ка биљном свету као основи ка развоју нових и моћних лекова. Имајући у виду невероватан потенцијал биљака, велико је интересовање фармацеутске индустрије за проналаском супстанци из биљних извора (82, 83).

1.6.1. Улога сремуша у инфламацији

Као што је већ наведено, биљке које припадају роду *Allium* познате су по органосумпорним једињењима које поред бројних терапијских бенефита показују и антиинфламацијски потенцијал (84). Претходна студија имала је за циљ да процени антиинфламаторно дејство екстракта лишћа и цветова сремуша на моделу инфламације пацова изазване терпентинским уљем. Резултати су показали да тестирани екстракти лишћа и цвета испољавају антиинфламацијску активност (70). Истраживања која су испитивала антиинфламаторно деловање сремуша су ограничена и нема довољно података који би указали на улогу ове биљне врсте у инфламацији. Међутим, бројни докази указују на снажан утицај белог лука на смањење запаљења. Наиме показано је да бели лук појачава функционисање имунског система и модулира секрецију цитокина. Обзиром на сличан хемијски састав белог лука и сремуша, очекује се да би сремуш такође могао значајно утицати на имунорегулацију (85, 86).

Поред органосумпорних једињења, све више доказа иде у прилог томе да полифеноли могу спречити, ублажити или допринети превенцији и/или лечењу многих стања и болести повезаних са хроничним или систематским инфламацијом. У том смислу, фокус научне јавности је на употреби полифенола из хране који показују капацитет да умање запаљенски одговор. Потенцијал сремуша да ублажи инфламацију може допринети лечењу и превенцији патологија као што су гојазност, метаболички синдром, кардиоваскуларни поремећаји, рак (85, 86).

1.7. Оксидациони стрес: улога сремуша

Слободни радикали настају током одвијања физиолошких процеса као што су дисање, варење хране, а такође и услед метаболизма лекова итд. У ниским концентрацијама корисни су у одржавању ћелијских функција. Међутим, организам је током еволуције развио систем одбране који подразумева учешће природних антиоксиданаса који спречавају штетне ефекте прооксиданаса. Разликују се антиоксиданси који могу да деактивирају активне кисеоничне врсте чиме спречавају настанак нових слободних радикала, као и антиоксиданси чији се механизам базира на хватању кисеоничних радикала (87). Проблем настаје уколико капацитет антиоксиданаса није довољан да неутралише настале количине слободних радикала и то стање означава се као оксидациони стрес.

Оксидациони стрес заузима важну улогу у развоју и патогенези бројних акутних и хроничних болести и стога је велика пажња научника и клиничара усмерена ка испитивању ефикасности примене различитих антиоксиданаса. Наиме, прекомерна концентрација прооксиданаса води ка нарушавању протеина ћелије, пероксидације липида што у крајњем мења структурне и функционалне карактеристике ћелија. Опасност проистиче и из потенцијала прооксиданаса да оштете ДНК, што носи са собом озбиљне последице (88). Прооксиданси/оксиданси који настају у биолошким системима доминантно припадају РОС и реактивним врстама азота (енгл. *reactive nitrogen species*-PNS) и приказани су у табели 3. Према начину деловања антиоксиданти се деле на: ензимске и неензимске који су такође приказани у табели (89).

Бројни докази иду у прилог томе да високе концентрације прооксиданаса доприносе развоју и прогресији дијабетеса, хипертензије, малигних болести, ИБС итд. У том смислу, ефикасни терапијски протокол могао би се базирати и на примени антиоксиданаса самостално и/или у комбинацији са адекватном фармаколошком терапијом. Такође, промене у животним навикама које би се заснивале на употреби

антиоксиданаса могле би бити изузетно значајне у профилакси хроничних болести. (90, 91).

Табела 3. Најзначајнији прооксиданси и антиоксиданси у организму

Прооксиданси		Антиоксиданси	
Реактивне врсте кисеоника - ROS		Ензимски антиоксиданси	
Супероксид анион радикал	$O_2^{\cdot-}$	Супероксид дизмутаза	SOD
Хидроксил радикал	$OH\cdot$	Каталаза	CAT
Пероксил радикал	$ROO\cdot$	Глутатион пероксидаза	GPx
Алкоксил радикал	$RO\cdot$	Глутатион редуктаза	GR
Хидропероксил радикал	$HOO\cdot$		
Водоник пероксид	H_2O_2		
Хипохлорна киселина	$HOCl$		
Озон	O_3		
Реактивне врсте азота - RNS		Неензимски антиоксиданси	
Азот-моноксид радикал	$NO\cdot$	Редуковани глутатион	GSH
Азот-диоксид радикал	$NO_2\cdot$	Витамини	
Пероксинитрит анион	$ONONO^-$	Полифеноли	
Алкил пероксинитрит	$ROONO$		

Полифеноли присутни у лековитим биљкама попут сремуша могу испољити бројне протективне фармаколошке ефекте, али се њихов највећи терапијски значај приписује капацитету да ублаже оксидациони стрес. Документовано је да унос полифенола смањује инфламацију и неутралише штетне ефекте прооксиданаса чиме се остварују изражени бенефити код пацијената са КВБ. Антиоксидациони ефекти полифенола обухватају неутрализацију слободних радикала или измену активности ензима антиоксидационе заштите (92, 93). Сремуш је широко препознат у традиционалној медицини, а његова лековита својства препозната су у народу од давних дана. Студије указују на антиоксидационо дејство сремуша, међутим недостатак је што су углавном тестирале *in vitro* активност сремуша што није адекватна предикција *in vivo* биолошких ефеката.

Ова студија имала је за циљ да испита да ли би коришћење екстракта сремуша утицало на системску редокс равнотежу. Посебна актуелност ове студије базира се на праћењу утицаја ове биљке на системске маркере оксидационог стреса и код здравих и хипертензивних пацова у три дозе. Сазнања добијена на основу овог истраживања пружила би смернице ка примени сремуша у целости, биљних екстраката или изолованих једињења као адитивне стратегије у лечењу кардиоваскуларних патологија. Проучавањем сремуша се отварају нове профилактичке и терапијске могућности које би се лако имплементирале имајући у виду да се сремуш већ вековима користи у исхрани и оправдао је поверење бројних корисника традиционалне и алтернативне медицине.

2. ЦИЉЕВИ

На основу свега претходно изложеног циљеви овог истраживања су били следећи:

2.1. Општи циљеви

1. Испитивање и компарација антимикробних ефеката растућих доза екстракта сремуша.
2. Испитивање и компарација антиинфламацијских ефеката растућих доза екстракта сремуша.
3. Испитивање утицаја хроничне примене екстракта сремуша у моделу прекондиционирања на функцију миокарда и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.

2.2. Специфични циљеви

1. Хемијска карактеризација екстракта сремуша и одређивање способности неутрализације DPPH радикала.
2. Испитивање утицаја хроничне примене екстракта сремуша на маркера оксидационог оштећења и антиоксидационе заштите из крви пацова.
3. Испитивање утицаја хроничне примене екстракта сремуша на биомаркере срчаног оксидационог оштећења.
4. Испитивање утицаја хроничне примене екстракта сремуша на морфолошке промене бубрега и јетре пацова.
5. Испитивање утицаја хроничне примене екстракта сремуша на морфолошке промене миокарда настале након исхемије.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

3.1 Етички аспекти

Студија је одобрена од стране Етичког комитета Факултета медицинских наука. Све експерименталне процедуре су се спроводиле у Лабораторији за кардиоваскуларну физиологију Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу. 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/EEC*) односно спороведене су према принципима Добре лабораторијске праксе и правилима о добробити животиња.

3.2 Припрема биљног материјала и процес екстракције

За процес екстракције су коришћени свежи листови сремуша који су сакупљени у марту месецу на планини Букуља у близини Аранђеловца. Водени, метанолни и хлороформски екстракти су припремљени екстраховањем 100 g листа сремуша са 500 ml растварача методом екстракције рефлуксом (енгл. *heat reflux extraction*), у трајању од 2 сата. Добијени екстракти су процеђени и остављени на тамном месту ради таложења баластних материја. Након тога су филтрирани кроз филтер папир. Суви екстракти су добијени упаравањем под сниженим притиском помоћу ротационог вакуум упаривача. Суви остатак је чуван у тамној стакленој бочици на 4 ° C за даљу припрему.

3.3. Хемијска анализа екстраката

3.3.1. Одређивање садржаја специфичних једињења HPLC-MS/MS техником

3.3.1.1. Реагенси

У циљу детекције одабраних полифенола HPLC-MS/MS техником коришћени су следећи реагенси: хексан, метанол, мравља киселина и референтни стандарди.

3.3.1.2. Поступак

Поступак идентификације полифенола у екстрактима сремуша спроведен је помоћу течне хроматографије помоћу *Agilent Technologies 1200 HPLC-DAD* куплованим са *Agilent Technologies 6410A ESI-QqQ-MS/MS*. Припрема екстраката подразумевала је растварање у диметилсулфоксиду (ДМСО) и разблаживање са 50 % метанолом да се добију концентрације: 20,0, 2,0 и 0,2 mg/ml. Припремљено је 15 стандарда концентрације од 1,53 ng/ml до $25,0 \cdot 10^3$ ng/ml, серијским разблаживањем у односу 1:1 смешом дестиловане воде и метанола. Узорци запремине 5 μ L узимани су за анализу и раздвајани помоћу *Zorbax Eclipse XDB-C18* колоне (50 mm \times 4,6 mm, величина честица 1,8 μ m) при константној температури од 50°C. 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 мин 70 %, 9 мин 100 %, 12 мин 100 %, при чему је време ре-еквилибрације износило 3 минута.

Идентификација једињења спроведена је тако што се вршило поређење спекатара и ретенционог времена супстанце са спектром и ретенционим временом стандарда. Потврда идентификације одабраних једињења омогућена је праћењем UV/VIS сигнала у опсегу 190–700 nm након чега је ефлуенс прослеђен на MS/MS детектор. Следећи параметри јонског извора били су подешени: 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 (енгл. *selected reactions monitoring- SRM*). За читавање површине пикова из хроматограма коришћен је *MassHunter Workstation Qualitative Analysis* софтвер, верзија В.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 се).

3.3.2. Одређивање укупног садржаја фенола

3.3.2.1. Реагенси

За одређивање укупног садржаја фенола коришћени су следећи реагенси: *Folin-Ciocalteu* (FC реагенс-0,1 М), раствор Na₂CO₃ (75 g/L), раствор галне киселине у 11 концентрација од 0,625- 80 µg/ml што представља стандарде.

3.3.2.2. Поступак

Спектрофотометријска метода утврђена од стране Singleton-а и сарадника прилагођена за микроплоче коришћена је за процену укупног садржаја фенола у екстрактима сремуша. FC реагенс је коришћен у наведеној анализи и садржи смешу фосфоволфрамове и фосфомолибденске киселине. Наведена метода базира се на оксидацији полифенолних једињења у присуству FC реагенса до феноксидних ањона, при чему истовремено долази до редукције 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 тестираним екстрактима.

Екстракти су коришћени у концентрацијама 0,125, 0,25 и 1 mg/ml за водени и метанолни и 0,03125, 0,0625 и 0,25 mg/ml за хлороформски. 30 µL екстракта помеша се са 150 µL 0,1 М FC реагенса и 120 µL 75 g/L Na₂CO₃. Након 2 сата на собној температури апсорбација раствора је очитана спектрофотометријски на таласној дужини 760 nm. Садржај полифенола израчунат је помоћу калибрационе криве стандардног раствора галне киселине, тј. као функција апсорбације у зависности од концентрације. Резултат је приказан помоћу средње вредности три мерења и представља mg еквивалената галне киселине по g сувог екстракта.

3.3.3. Одређивање укупног садржаја флавоноида

3.3.3.1. Реагенси

Реагенси који су коришћени за одређивање укупног флавоноидног садржаја у екстрактима сремуша били су следећи: AlCl_3 (0,75 М), CH_3COONa (1 М), раствор кверцетина у концентрацијама од 0,625-84 $\mu\text{g/ml}$ што представља стандард.

3.3.3.2. Поступак

Укупни садржај флавоноида одређен је према претходно утврђеној методи *Chang*-а и сарадника која је прилагођена за микро плоче (94). Метода се заснива на чињеници да флавоноиди са металима граде одговарајуће 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 апсорбанције на $\lambda=415 \text{ nm}$ и пропорционалан је садржају флавоноида у испитиваном узорку.

Раствори испитиваних екстраката били су у концентрацијама 0,25, 1 и 4 mg/ml за водени и метанолни и 0,0625, 0,25 и 1 mg/ml за хлороформски екстракт. 30 μL екстракта помеша се 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 очитавана спектрофотометријски на $\lambda=415 \text{ nm}$ 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. Одређивање способности екстраката да неутралишу DPPH^\bullet радикал

За одређивање способности екстраката сремуша да неутралишу DPPH^\bullet (1,1-дифенил-2-пикрилхидразил) радикал коришћена је спектрофотометријска метода аутора *Sánchez-Moreno* и сарадника, прилагођена за микроплоче (95).

3.4.1. Реагенси

За одређивање способности екстраката сремуша да неутралишу DPPH^\bullet коришћени су следећи реагенси: основни раствор DPPH^\bullet реагенса који се састоји од 3 mM DPPH^\bullet у етанолу, радног раствора DPPH^\bullet реагенса који се добија када се раствори 67,2 μM DPPH^\bullet у метанолу и екстракти.

3.4.2. Поступак

Наведена метода се базира на промени боје раствора услед реакције фенола са DPPH[•] из љубичасте у жуту боју. Антиоксидативни потенцијал екстраката одређен је помоћу претходно прилагођених тестова за микроплоче.

Осушени екстракти су растворени у диметил сулфоксиду да се добије концентрација 200 mg/ml за водени и металолни и 176,3 mg/ml за хлороформски екстракт. За испитивање антиоксидационе активности Stock раствори су растворени у H₂O, 50% метанолу и ДМСО за водени, метанолни и хлороформски екстракт. Коришћене су концентрације екстраката од 0,125–16 mg/ml. 10 µl сваког екстракта у низу концентрација додато је у 100 µl раствора од 90 µmol/l DPPH у метанолу и смеша је разблажена са додатних 190 µl метанола. У контролама је 10 µl узорка замењено са H₂O за водени, 50% метанол за метанолни или ДМСО за хлороформски екстракт. За добијање следеће пробе помешани су само метанол (290 µl) и сваки узорак екстракта (10 µl), док се слепа проба за контролу добила мешањем метанола (290 µl) и растварача са којим је одговарајући екстракт разблажен (10 µl). Мерења апсорбације прочитана су на 515 nm након 1 сата. Сви узорци и контрола направљени су за мерење у три понављања.

Процент инхибиције постигнут различитим концентрацијама узорака израчунат је употребом следеће једначине:

$$I (\%) = (A_0 - A) / A_0 \times 100$$

где је A₀ апсорбанца контроле, а A апсорбанца испитиваних узорака, оба коригована за вредност одговарајућих слепих проба.

Одговарајуће криве зависности инхибиције од концентрације креиране су коришћењем софтвера *Origin*, верзија 8.0 и вредности IC₅₀ (концентрација екстракта који инхибира стварање DPPH[•] за 50%). Коначни резултат је изражен као средња вредност ± стандардна девијација (СД) три мерења у µg/mL.

3.5. Одређивање антимикуробне активности екстраката сремуса

3.5.1. Супстанце

Коришћене су следеће супстанце: ресазурин, антибиотик доксициклин који је растворен у хранљивом течном медијуму Mueller-Hinton бујон и антимикуротик флуконазол растворен у Sabouraud dextrose бујону. Хранљиве подлоге Mueller-Hinton и Sabouraud dextrose бујон добијени су са Торлака, Београд. Тестирани екстракти растворени су у ДМСО и затим разблажени у хранљивом течном медијуму да би се постигла концентрација од 10%.

3.5.2. Тестирани микроорганизми

Антимикуробна активност екстраката сремуса је тестирана на 20 микроорганизмама. Коришћено је 10 патогених бактерија, 6 стандардних сојева и 4 клиничка изолата. Такође је тестирано седам врста плесни и три врсте квасца, укључујући пет стандардних сојева и пет изолата из хране и природе. Сви клинички изолати добијени су са Института за јавно здравље Крагујевац. Остали микроорганизми су обезбеђени из колекције коју је држала Лабораторија за микробиологију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу.

3.5.3. Припрема суспензије

Колоније бактерија и гљива суспендоване су стерилном физиолошком раствору, а густина је праћена дензитометром. Када се прилагоди густини од 0,5 McFarland стандарда, суспензија бактерија садржи око 10^8 CFU/mL, а суспензије квасца око 10^6 CFU/ml.

3.5.4. Поступак

Коришћена је микродилуциона метода уз помоћ ресазурина који мења боју од плаве до розе у контакту са оксидоредуктазама живих ћелија (96). Антимикробна активност тестирана је одређивањем минималне инхибиторне концентрације (МИК) и минималне микробицидне концентрације (ММК). У плоче са 96 отвора додато је 100 μ l хранљиве подлоге. У први ред плоче дода се аликвот од 100 μ l из матичног раствора испитиваних екстраката са концентрацијом од 10 mg/ml. Затим су изведена двострука серијска разблажења употребом вишеканалне пипете. Добијени опсег концентрације био је од 5 до 0,078 mg/ml. Сваки тест је укључивао контролу раста и контролу стерилности. Сви тестови су изведени једнократно. Минималне микробицидне концентрације утврђене су пребацавањем 10 μ l узорка из отвора у којима није забележена промена индикатора или раст мицелија на хранљивом агарном медијуму. На крају периода инкубације, најнижа концентрација без колоније дефинисана је као минимална микробицидна концентрација.

Табела 4. Тестирани микроорганизми

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

3.6. Одређивање антиинфламаторне активности екстракта сремуша

3.6.1. Супстанце

Супстанце које су коришћене за одређивање антиинфламаторне активности екстракта сремуша су карагенин и стандардни лек индометацин.

3.6.2. Експериментална процедура

За одређивање антиедематозне активности коришћен је модел карагенином изазване инфламације шапе пацова. Када се карагенин примени интраплантарно у шапу пацова долази до развоја акутне инфламације, а клиничка слика подразумева развој еритема, едема и хипералгезије. За испитивање антиинфламацијске активности одабран је метанолни екстракт имајући у виду његов најоптималнији хемијски састав у поређењу са воденим и хлороформским.

У овај део истраживања укључено је 50 одраслих пацова *Wistar* соја, мушког пола, старости 8 недеља, телесне масе 200-250g. Животиње су биле 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*). Инфламација се развија након апликације 1 mL 0,5% физиолошког раствора карагенина интраплантарно у задњу леву шапу пацова.

Пацови су били подељени у пет група на следећи начин (10 пацова по групи):

- 1) **50 AUE** – интраперитонеална (i.p.) апликација метанолног екстракта сремуша у дози од 50 mg/kg 60 минута пре апликације карагенина;
- 2) **100 AUE** – i.p. апликација метанолног екстракта сремуша у дози од 100 mg/kg 60 минута пре апликације карагенина;
- 3) **200 AUE** – i.p. апликација метанолног екстракта сремуша у дози од 200 mg/kg 60 минута пре апликације карагенина;
- 4) **индометацин** - i.p. апликација индометацина у дози од 8 mg/kg, 60 минута пре апликације карагенина;
- 5) **контрола** - i.p. апликација физиолошког раствора, 60 минута пре апликације карагенина.

3.6.3. Процена антиедематозне активности екстракта

Антиедематозна активност екстракта сремуша у растућим дозама процењена је на основу дебљине леве шапе пацова у следећим тренуцима: пре примене карагенина (0 сат) и након 1,2,3 и 4 h. Дебљина ткива се мери на средини шапе помоћу дигиталног калипера. Процент инхибиције едема шапе се израчунава на основу вредности дебљине шапе према формули:

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

где Y_t представља разлику у дебљини шапе у групи пацова на третману између одређеног тренутка времена и нултог тренутка, а Y_c представља разлику у дебљини шапе у групи пацова којима је апликован физиолошки раствор између одређеног тренутка времена и нултог тренутка.

3.7. Одређивање ефеката екстракта сремуша на системски редокс статус и *ex vivo* И-Р повреду пацова

Ово је експериментална студија 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/EEC) и принципа етичности.

3.7.1. Експерименталне животиње

У овом делу истраживања користили су се здрави и спонтано хипертензивни *Wistar* пацови мушког пола, старости 8 недеља, телесне масе 200-250g. Укупан број пацова (80) био је подељен у две групе, здрави и спонтано хипертензивни, пацови, у оквиру којих се разликује 4 подгрупа. Свим пацовима акутно је изазвана И-Р повреда према протоколу који ће бити објашњен у даљем тексту.

Здрави пацови:

- 1) **CTRL**- пацови без третмана којима је изазвана И-Р повреда срца;
- 2) **125 AUE**- пацови који су током 4 недеље пре изазивања И-Р повреде срца свакодневно орално користили екстракт сремуша у дози од 125 mg/kg;
- 3) **250 AUE**- пацови који су током 4 недеље пре изазивања И-Р повреде срца свакодневно орално користили екстракт сремуша у дози од 250 mg/kg;
- 4) **500 AUE**- пацови који су током 4 недеље пре изазивања И-Р повреде срца свакодневно орално користили екстракт сремуша у дози од 500 mg/kg;

Спонтано хипертензивни пацови:

- 1) **SHR**- пацови без третмана којима је изазвана И-Р повреда срца;
- 2) **H125 AUE**- пацови који су током 4 недеље пре изазивања И-Р повреде срца свакодневно орално користили екстракт сремуша у дози од 125 mg/kg;
- 3) **H250 AUE**- пацови који су током 4 недеље пре изазивања И-Р повреде срца свакодневно орално користили екстракт сремуша у дози од 250 mg/kg;
- 4) **H500 AUE**- пацови који су током 4 недеље пре изазивања И-Р повреде срца свакодневно орално користили екстракт сремуша у дози од 500 mg/kg;

3.7.2. Одређивање системског редокс статуса

Како би се испитали ефекти сремуша на системски ниво прооксиданаса и антиоксиданаса крв је прикупљена након 4 недеље третмана. У узорцима плазме одређивани су нивои прооксиданаса: индекса липидне пероксидације, мерени као TBARS, NO_2^- , O_2^- и H_2O_2 . У узорцима лизата еритроцита одређивани су нивои антиоксиданаса: CAT, SOD и GSH. Све биохемијске анализе одрађене су спектрофотометријски (*Specord S-600 Analytik Jena*, Велика Британија).

3.7.2.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (мерен као TBARS)

Индекс липидне пероксидације одређиван је индиректно мерењем продуката 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) (97).

3.7.2.1.1. Реагенси

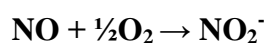
Реагенси који су коришћени за одређивање нивоа TBARS су: 2-тиобарбитурна киселина (ТВА), 28% трихлорсирћетне киселине (ТСА) и натријум хидроксид (NaOH).

3.7.2.1.2. Поступак

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. Након тога узорци се оставе 15 минута на собној температури пре одређивања апсорбанције. Апсорбанција је мерена спектрофотометријски на $\lambda=530\text{nm}$. Дестилована вода је коришћен као слепа проба, у количини еквивалентној запремини плазме. Концентрација ослобођених TBARS израчуната је на основу једначине из претходно публиковане студије (97). Ниво TBARS се изражава у μM , за разлику од осталих мерених прооксиданаса чија је концентрација изражавана у nM јер је количина TBARS за један ранг величина већа од свих осталих параметара.

3.7.2.2. Одређивање нитрита (NO_2^-)

Мерење нивоа ослобођених нитрита 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 узорку заправо ниво ослобођеног азот моноксида. Метода се заснива на коришћењу *Griess*-ов реагенса који у присуству нитрита доводи до настанка диазо-комплекса љубичасте боје (97).

3.7.2.2.1. 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).

3.7.2.2.2. 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 епрувету (12 x 100) се пипетира 1 ml узорка, 250 μ L свеже направљеног *Griess*-ов реагенса и 125 μ L 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 μ L 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 nmol NO_2^-/mL . Након 5-10 минута долази до стабилизације боје на собној температури и приступа се одређивању концентрације ослобођених нитрита спектрофотометријски на таласној дужини од $\lambda=550$ nm. Концентрација, а затим количина ослобођених нитрита добијена је на основу једначине из претходно публиковане студије (97).

3.7.2.3. Одређивање супероксид анјон радикала (O_2^-)

Одређивање количине супероксид анјон радикала (O_2^-) у плазми заснива се на реакцији O_2^- са нитро тетразолијум плавим (енгл. *Nitro Blue Tetrazolium*, NBT) при чему настаје нитроформазаз плави. Мерење се спроводи на таласној дужини $\lambda_{\text{max}}=550\text{nm}$ (97).

3.7.2. 3.1. Реагенси

Реагенси који су коришћени за одређивање нивоа O_2^- су: TRIS (Трис (хидроксиметил) аминометан, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$), 37% хлороводонична киселина (HCl), $\rho=1,19$ gcm^{-3} , Na_2EDTA , Нитро-тетразолијум плаво хлорид (NBT, $\text{C}_{40}\text{H}_{30}\text{ClN}_{10}\text{O}_6$), Желатин ($\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N}_2 \text{NaO}_2$).

3.7.2.3.2. 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 плазме ефлуента коришћена је дестилована вода. На почетку реакције измери се екстинкција смеше и то се означава као екстинкција E_1 . 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 E_2 . Исти поступак се спроводи и за слепу пробу. Концентрација ослобођеног O_2^- добијена је на основу једначина из претходно описане студије (97).

3.7.2. 4. Одређивање водоник пероксида (H_2O_2)

Одређивање H_2O_2 заснива се на оксидацији фенол црвеног помоћу водоник пероксид реакције која је катализована ензимом пероксидазом из коњске ротквице (енгл. *Horseshoe Radish Peroxidase* - HRPO). Ова реакција доводи до формирања једињења чији је максимум апсорпције $\lambda_{max}=610$ nm. Линеарна зависност апсорбанце 610 nm од концентрациј H_2O_2 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 (97).

3.7.2. 4.1. Реагенси

Реагенси који су коришћени за одређивање нивоа H_2O_2 су: калијум хидрогенфосфат дихидрат ($K_2HPO_4 \times 2H_2O$), калијум дихидрогенфосфат дихидрат ($KH_2PO_4 \times 2H_2O$), натријум хлорид (NaCl), водоник пероксид (H_2O_2), D(+)-глюкоза монохидрат (декстроза), фенол црвено (енгл. *phenol red*, $C_{19}H_{14}O_5S$), пероксидаза из коњске ротквице (енгл. *peroxidase from horse radish*, HRPO EC 1.11.1.7).

3.7.2.4.2. Поступак

У епрувете (12x100) се пипетира 200 μ L узорка и 800 μ L свежe направљеног раствора фенол црвеног (енгл. *Phenol Red Solution-PRS*). PRS настаје мешањем 140 mM NaCl, 10 mM калијум фосфатног пуфера (pH =7), 5,5 mM D(+)-глюкозе и 0,28 mM фенол црвеног. Након тога се у узорке дода 10 μ L (1:20) HRPO који је припремљен *ex tempore*. Узорци се остављају на собној температури 10 минута, након чега се помоћу 1 M NaOH подеси pH \approx 12. Као слепа проба се користи дестилована вода уместо плазме.

Концентрација ослобођеног H_2O_2 у плазми 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 μ L 1 mM раствора H_2O_2 , 200 μ L дестиловане, 800 μ L раствора фенол црвеног и 10 μ L (1:20) HRPO. Након инкубације у трајању од 10 минута на собној температури, подешава се pH вредност око 12 помоћу 10 μ L 1 M NaOH. Финална концентрација H_2O_2 у 3 узорка стандарда износила је: 2,75; 5,49; и 10,99 nmol/ H_2O_2 /mL.

Мерење апсорбанце (A) спровођене су спектрофотометријски на таласној дужини максималне апсорпције $\lambda_{max}=610$ nm, у стакленим киветама запремине 1 mL. Од добијених апсорбанци одузима се вредност апсорбанце слепе пробе (B), чиме се добија коначна апсорбанца (ΔA). Концентрација, а затим и количина ослобођеног H_2O_2 у узорку израчунавана је на основу претходно описаних формула (97).

3.7.2. 5. Одређивање каталазе (CAT)

Активност каталазе у сонификату одређује се применом методе по *Beutler*-у (98). 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 према претходно описаној формули (97, 98).

3.7.2.5.1. 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 претходно описаној једначини (97, 98).

3.7.2. 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 $\text{O}_2^{\cdot -}$. SOD уклања $\text{O}_2^{\cdot -}$ и на тај начин спречава аутооксидацију епинефрина (99). 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.

3.7.2.6.1. 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 претходно описаној реакцији (97, 99).

3.7.2.7. 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-нитробензојеве киселином (DTNB) (100).

3.7.2. 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 μL узорка, 750 μL Na_2HPO_4 и 100 μL 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. Концентрација глутатиона у венском ефлуенту израчуната је према претходно описаној формули (100).

3.7.3. Испитивање *ex vivo* функције срца

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

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

Модел изоловане ретроградне перфузије по *Langendorff*-у истиче се као адекватан за проучавање функције срца и коронарне циркулације изолованог срца сисара (пас, заморчић, пацов, зец, мачка). Постоје две технике рада на *Langendorff* апарату, при чему 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 примењена је метода 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 асцендентне 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 рада леве коморе и то бележењем следећих параметара:

- $dp/dt \max$ – 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. Праћен је рад леве коморе, као морфолошки и функционално доминантије, што може осликати рад срца у целости.

3.7.3.2. *Krebs-Hensenleit* раствор за перфундовање срца

Krebs-Hensenleit 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 ($MgSO_4 \times 7H_2O$ – 1,66 mmol/L), калијум дихидроген фосфат ($KH_2PO_4 \times 2H_2O$ – 1,18 mmol/L), натријум бикарбонат (NaHCO₃ – 24,88 mmol/L), глукоза ($C_6H_{12}O_6 \times H_2O$ – 5,5 mmol/L) и калцијум хлорид (CaCl₂ – 2,52 mmol/L). pH вредност раствора износи 7,4.

3.7.3.3. *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.

3.7.3.4. *Експериментални протокол*

Након постављања срца на апарат неопходно је да прође одређени временски период док не дође до успостављање стабилног рада срца. Стабилан срчани рад се потврђује детектовањем непромењених вредности коронарног протока и параметара функције срца након неколико узастопних мерења. На самом крају периода стабилизације (С) регистровани су параметри од интереса софтверски и сакупљан је коронарни венски ефлуент. Након тога је изазвана глобална исхемија. Глобална исхемија у трајању од 20 минута изазвана је потпуним затварањем протока на

Langendorff-овом апарату тако да до срца не стиже *Krebs Henseleit*-ов раствор, а ни кисеоник, па је срце у потпуној хипоксији. Након исхемије у трајању од 20 минута успостављена је реперфузија (поновно успостављање протока) у трајању од 30 минута. Коронарни венски ефлуент прикупљен је у следећим тачкама од интереса: тачки стабилизације (C), у првом (P1), петом (P2), десетом (P3), петнаестом (P4), двадесетом (P5), двадесетпетом (P6) и тридесетом (P7) минути реперфузије. У наведеним интервалима софтверски су бележени и сви претходно наведени кардиодинамски параметри.

3.8. Испитивање ефеката екстракта сремуша на срчани редокс статус

Из узорака коронарног венског ефлуента који је прикупљен је у тачки стабилизације (C), у првој тачки реперфузије (P1), као и на сваких 5 минута током периода реперфузије (P2-P7) одређиван је ниво прооксиданса као у плазми: индекс липидне пероксидације мерен као TBARS, NO_2^- , O_2^- и H_2O_2 .

Протокол за одређивање прооксиданаса исти је као у случају плазме, изузев што се уместо дестиловане воде за припрему слебе пробе користи *Krebs-Henseleit* раствор. Међутим, протокол за одређивање нивоа TBARS у коронарном венском ефлуенту се незнатно разликује у односу на протокол за плазму. У епрувету је стављено 800 μL узорка и 200 μL 1% TBA у 0,05 M натријум хидроксиду након чега су узорци инкубирани у воденом купатилу у трајању од 15 минута при чему је даљи протокол исти као за плазму. *Krebs-Henseleit* раствор је коришћен као слепа проба, у запремини додатог коронарног венског ефлуента.

3.9. Хистопатолошка анализа

Након жртвовања пацова по истеку четворонедељног протокола изоловани су бубрег и јетра сваке животиње. По завршетку праћења *ex vivo* функције срца срца су издвојена за хистолошку анализу. Јетра, бубрег и срце су фиксирани у 10% раствору формалдехида на собној температури, након чега су калупљени у парафинске блокове и исечени на резове дебљине 5 μm помоћу микротоме. За праћење структурних промена органа под утицајем примене екстракта сремуша коришћено је хематоксилин и еозин (H&E) бојење.

Након загревања парафинских исечака у термостату на +56 °C током 45 минута, спроведен је поступак депарафинисања у ксилолу. Препарати су бојени *Mayer*-овим хематоксилином 10 минута, а потом су испирани дестилованом водом, а након тога текућом водом у трајању од 5 минута. Препарати су затим бојени алкохолним еозином 2 минута. Након бојења ткиво је дехидратисано и просветљено у ксилолу. У циљу дехидратације коришћене су растуће концентрације алкохола, а након бојења и дехидратације узорци су потопљени 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 и покровним стаклима. Након сушења у трајању од 24 сата препарати су анализирани под светлосним микроскопом (*Olympus, Japan*). Резултати хистопатолошке анализе, односно H&E бојења ћелија, представљени су сликама..

3.10. Снага студије и величина узорка

Прорачун укупног узорка базира се на резултатима претходно публикованих радова. 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 (101).

Имајући у виду претходну студију, укупан број животиња је прорачунат на 104 (по 8 у свакој групи). Међутим, како се пацови могу искључити из студије услед непредвиђених околности, укупни студијски узорак је дефинисан на 130 експерименталних животиња.

3.11. Статистичка обрада података

Статистички пакет IBM SPSS 20.0 за *Windows* коришћен је за обраду података. За испитивање нормалности расподеле коришћени су *Kolmogorov Smirnov* и *Shapiro Wilk* тест и *normal QQ plot*. За утврђивање значајности између параметара од интереса коришћена је једнофакторска или двофакторска анализа варијансе, уз *Bonferroni* тест. Вредност $p < 0,05$ указује на статистички значајну, а вредност $p < 0,01$ на статистички високо значајну разлику. Вредности испитиваних параметара приказане су као средња вредност (\bar{X}) \pm стандардна девијација (SD). За креирање графикана и табела коришћен је *Microsoft Excel*.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Хемијска анализа екстракта сремуша

У оквиру хемијске анализе екстракта сремуша спроведене су следеће анализе: квантитативно-квалитативно одређивање садржаја специфичних полифенола, одређивање садржаја укупних фенола и флавоноида.

4.1.1. Садржај одабраних полифенолних једињења у екстрактима сремуша

HPLC анализа метанолног, воденог и хлороформског екстракта сремуша указала је на присуство сличних полифенола у сва три екстракта, али у различитим концентрацијама. Састав одабраних једињења приказан је у табели 5. Најзаступљенија једињења у воденом и метанолном екстракту су кемпферол 3-O-Glc, р-кумаринска киселина, ферулинска киселина, кемпферол, с тим што је њихова концентрација виша у воденом екстракту. У хлороформском екстракту такође су доминантно заступљена наведена једињења, при чему се истиче још и урсолна киселина. Највиша концентрација ферулинске киселине и кемпферола била је у хлороформском екстракту.

Табела 5. Концентрација одабраних полифенола у $\mu\text{g/g}$ сувог екстракта сремуша

Назив једињења	Водени екстракт	Метанолни екстракт	Хлороформски екстракт
<i>прокатехинска киселина</i>	0,20±0,02	< 0,075	< 0,076
<i>р-кумаринска киселина</i>	18,79±1,69	9,92±0,89	2,22±0,20
<i>ванилинска киселина</i>	< 0,61	< 0,61	< 0,61
<i>кафеинска киселина</i>	0,95±0,07	0,32±0,02	< 0,075
<i>ферулинска киселина</i>	12,59±1,26	7,55±0,76	33,88±3,9
<i>р-хидроксибензоева киселина</i>	5,56±0,44	0,88±0,05	0,36±0,02
<i>кемпферол</i>	10,20±0,71	6,75±0,47	38,70±2,71
<i>Витексин</i>	0,29±0,01	0,56±0,03	< 0,16
<i>кемпферол 3-O-Glc</i>	1055±42	376±15	10±0,4
<i>лутеолин 7-O-Glc</i>	< 0,075	< 0,075	< 0,075
<i>кверцетин 3-O-Glc</i>	< 0,155	< 0,155	< 0,155
<i>рутин</i>	0,22±0,01	0,48±0,01	0,19±0,01
<i>диосметин</i>	< 0,075	< 0,075	0,51
<i>рамнетин</i>	< 4,88	< 4,88	< 4,88
<i>урсолна киселина</i>	1,13±0,01	1,57±0,01	12,80±0,08
<i>рузмаринска киселина</i>	< 0,075	< 0,075	< 0,075
<i>ализарин</i>	< 2,44	< 2,44	< 2,44
<i>апигенин 7-O-Glc</i>	< 0,075	< 0,075	< 0,075
<i>апиин</i>	< 0,155	< 0,155	< 0,155
<i>бајкалин</i>	< 0,155	< 0,155	< 0,155
<i>елагинска киселина</i>	< 0,30	< 0,30	< 0,30
<i>епигалокатехин галат</i>	< 0,61	< 0,61	< 0,61
Назив једињења	Водени екстракт	Метанолни екстракт	Хлороформски екстракт

<i>епикатехин</i>	< 0,61	< 0,61	< 0,61
<i>глициризин</i>	< 0,155	< 0,155	< 0,155
<i>хесперетин</i>	< 0,30	< 0,30	< 0,30
<i>хиперозид</i>	< 0,30	< 0,30	< 0,30
<i>хлорогенска киселина</i>	< 0,30	< 0,30	< 0,30
<i>изорамнетин</i>	< 0,075	< 0,075	< 0,075
<i>катехин</i>	< 0,61	< 0,61	< 0,61
<i>кверцетин</i>	< 0,30	< 0,30	< 0,30
<i>кверцитрин</i>	< 0,155	< 0,155	< 0,155
<i>луотелин</i>	< 0,075	< 0,075	< 0,075
<i>мирицети</i>	< 19,55	< 19,55	< 19,55
<i>о-кумаринска киселина</i>	< 0,155	< 0,155	< 0,155

4.1.2 Садржај укупних фенола и флавоноида у екстрактима сремуша

Највећа концентрација укупних фенола била је присутна у хлороформском екстракту и износила је $60,47 \pm 5,95$ mg еквивалената галне киселине/g сувог екстракта. С друге стране, најнижи садржај полифенола био је присутан у метанолном екстракту ($33,29 \pm 3,13$ mg еквивалената галне киселине /g сувог екстракта). Хлороформски екстракт имао је такође и највећу концентрацију укупних флавоноида од $34,76 \pm 1,31$ mg еквивалената кверцетина/g сувог екстракта). С друге стране, најнижа концентрација била је присутна у воденом екстракту сремуша ($3,34 \pm 0,05$ mg еквивалената кверцетина/g сувог екстракта).

Табела 6. Укупан садржај фенола и флавоноида у екстрактима сремуша

	<i>Водени екстракт</i>	<i>Метанолни екстракт</i>	<i>Хлороформски екстракт</i>
<i>Укупни феноли</i>	$34,55 \pm 3,49$	$33,29 \pm 3,13$	$60,47 \pm 5,95$ ^{aa,bb}
<i>Укупни флавоноиди</i>	$3,34 \pm 0,05$	$6,86 \pm 0,10$ ^a	$34,76 \pm 1,31$ ^{aa,bb}

Дата је средња вредности три мерења \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). Садржај фенола изражен је у mg еквивалената ГЕ/g СЕ, ГЕ-гална киселина, СЕ- суви екстракт; садржај флавоноида изражен као mg КЕ/g СЕ, КЕ-кверцетин. ^aстатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са воденим екстрактом ^{aa}статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ у поређењу са воденим екстрактом. ^{bb} статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ у поређењу са метанолним екстрактом.

4.2. Капацитет екстраката сремуша да неутралишу DPPH• радикал

Резултати DPPH теста указују на то да је највећа активност карактеристична за метанолни екстракт, што се манифестује најнижим вредностима IC₅₀. С друге стране, најнижу антиоксидациону активност показао је хлороформски екстракт. Резултати су представљени у табели 7.

Табела 7. Капацитет екстраката сремуша да неутралишу DPPH• радикал

	Водени екстракт	Метанолни екстракт	Хлороформски екстракт
IC ₅₀ (µg/mL)	154,25 ± 3,50	111,04 ± 7,69 ^a	391,79 ± 33,01 ^{aa,bb}

Дата је средња вредности три мерења ± стандардна девијација ($X \pm SD$). ^aстатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са воденим екстрактом ^{aa}статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ у поређењу са воденим екстрактом. ^{bb}статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$ у поређењу са метанолним екстрактом.

4.3. Антимикробни ефекти екстраката сремуша

Резултати *in vitro* антимикробне активности екстраката против 20 сојева бактерија и гљивица, са резултатима контроле, утврђени су методом микродилуције. Резултати су представљени у табелама 8 и 9. Примећено је да раст микроорганизама није инхибирао 10% ДМСО. Генерално, екстракти су показали различит степен антимикробне активности. Интензитет антимикробног деловања варирао је у зависности од групе микроорганизама и врсте екстраката. Вредности МИК и ММК су биле у распону од 0,313 до > 5 mg/ml. Највећи антимикробни потенцијал међу тестираним екстрактима показао је хлороформски екстракт и то на Грам позитивне бактерије и филаментозне гљиве. Наведени екстракт је показао бољу антифунгалну активност од позитивне контроле (МИК - 0,313 mg/ml на *A. niger* ATCC 404). Међу бактеријама, *B. subtilis* ATCC 6633 је показала највећу осетљивост на тестиране екстракте. Тестирани екстракти показали су најмању активност против Грам негативних бактерија, са вредностима МИК углавном > 5 mg/ml.

Табела 8. Антибактеријска активност екстраката сремуша

Тип екстракта	Водени		Метанолни		Хлороформски		Доксициклин	
	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК
Микроорганизам	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	5	5	5	2,5	2,5	0,448	7,81
<i>S. aureus ATCC 25923</i>	>5	>5	>5	>5	5	>5	0,22	3,75
<i>Bacillus cereus</i>	5	>5	5	>5	2,5	2,5	0,977	7,81
<i>Bacillus subtilis</i>	>5	>5	>5	>5	5	5	0,112	1,953
<i>B. subtilis ATCC 6633</i>	2,5	5	1,25	2,5	0,313	0,625	1,953	31,25
<i>Escherichia coli ATCC 25922</i>	>5	>5	>5	>5	>5	>5	15,63	31,25
<i>Proteus mirabilis ATCC 12453</i>	>5	>5	>5	>5	5	>5	15,63	62,5
<i>Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853</i>	>5	>5	>5	>5	>5	>5	62,5	125
<i>Cronobacter sakazakii ATCC 29544</i>	>5	>5	>5	>5	>5	>5	/	/
<i>Salmonella enterica</i>	>5	>5	>5	>5	>5	>5	15,63	31,25

МИК- минимална инхибиторна концентрација; ММК- минимална микробицидна концентрација; за биљне екстракте изражена у mg/ml, а за доксициклин у µg/ml.

Тип екстракта	Водени		Метанолни		Хлороформски		Флуконазол	
	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК
Микроорганизам	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	5	5	2,5	5	>5	>5	31,25	500
<i>Saccharomyces boulardii</i>	>5	>5	>5	>5	0,625	5	7,81	31,25
<i>Candida albicans ATCC 10231</i>	5	>5	5	>5	5	>5	31,25	62,5
<i>Penicillium expansum</i>	>5	>5	5	>5	>5	>5	/	/
<i>P. chrysogenum</i>	5	>5	5	>5	>5	>5	1000	1000
<i>P. italicum</i>	2,5	>5	2,5	>5	5	>5	250	500
<i>T. viridae ATCC 13233</i>	5	>5	5	>5	2,5	5	500	1000
<i>A. flavus ATCC 9170</i>	>5	>5	>5	>5	0,625	2,5	500	500
<i>A. fumigatus ATCC 204305</i>	>5	>5	5	>5	2,5	5	1000	1000
<i>A. niger ATCC 16404</i>	5	>5	5	>5	0,313	2,5	1000	1000

Табела 9. Антигљивична активност екстраката сремуша

МИК- минимална инхибиторна концентрација; ММК- минимална микробицидна концентрација; за биљне екстракте изражена у mg/ml, а за флуконазол у µg/ml.

4.4. Антиинфламацијски ефекти екстраката сремуша

Након примене екстракта сремуша у дози од 200 mg/kg уочава се значајна инхибиција едема шапе пацова након 1., 2., 3. и 4. сата од инјекције карагенина у поређењу са контролном групом, при чему је најизраженија инхибиција постигнута након 4. сата (48,21 %). Доза екстракта од 100 mg/kg није довела до инхибиције едема у првом сату, међутим 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 10. Ефекти екстраката сремуша на промену дебљине шапе животиње

Повећање дебљине шапе пацова (mm) (% инхибиције)				
Групе	1h	2h	3h	4h
50 AUE	1,12 ± 0,05 (-1,82)	1,67 ± 0,1 (19,31)	1,73 ± 0,02 (12,62)	1,45 ± 0,001 (25,64)
100 AUE	0,92 ± 0,02 (16,36)	1,23 ± 0,03 (15,17)	1,45 ± 0,02 (26,77)	1,23 ± 0,01 (36,92)
200 AUE	0,77 ± 0,06 (30)	1,2 ± 0,02 (17,24)	1,13 ± 0,03 (42,9)	0,76 ± 0,05 (48,21)
Индометацин	0,67 ± 0,02 (39,09)	0,72 ± 0,03 (50,34)	1,02 ± 0,02 (50,5)	0,87 ± 0,02 (55,38)
Контрола	1,1 ± 0,02	1,45 ± 0,01	1,98 ± 0,02	1,95 ± 0,17

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

4.5. Утицај екстракта сремуша на маркере оксидационог стреса у крви пацова

4.5.1. Ефекти екстракта сремуша на системски редокс статус здравих пацова

4.5.1.1. Ефекти екстракта сремуша на прооксидационе параметре из крви здравих пацова

Из узорака плазме пацова који су били третирани екстрактом сремуша одређиване су вредности прооксидационих параметара: TBARS, NO₂⁻, O₂⁻ и H₂O₂. Вредности параметара након примене екстракта у три дозе (500 mg/kg, 250 mg/kg и 125 mg/kg) као и нетретираних пацова приказане су табеларно и графички (Табела 11, График 1). Вредности параметара су изражене као средња вредност ± стандардна девијација (X±SD) са статистички значајном разликом за вредност p<0,05.

Сви испитивани прооксиданси били су статистички значајно снижени у групи пацова која је користила сремуш у дози од 500 mg/kg у односу на контролне услове. Такође, апликација екстракта у дози од 250 mg/kg смањила је вредности O₂⁻, H₂O₂ и TBARS, док је најнижа доза довела је до смањења концентрације TBARS и H₂O₂ у поређењу са пацовима који нису били на третману. Поређем вредности прооксиданаса

између група на третману различитим дозама уочавају се ниже вредности свих маркера након третмана екстрактом у дози од 500 mg/kg у односу на 125 mg/kg.

Табела 11. Ефекти конзумације екстраката сремуша на прооксидационе параметре (TBARS, NO₂⁻, O₂⁻ и H₂O₂) у плазми здравих животиња

	TBARS (μmol/ml)	NO ₂ ⁻ (nmol/ml)	O ₂ ⁻ (nmol/ml)	H ₂ O ₂ (nmol/ml)
CTRL	1,2 ± 0,03	3,01 ± 0,1	1,45 ± 0,1	3,4 ± 0,4
125 AUE	0,74 ± 0,04* [#]	2,9 ± 0,2 [#]	1,32 ± 0,3 [#]	2,92 ± 0,1* [#]
250 AUE	0,69 ± 0,02*	2,89 ± 0,1	1,14 ± 0,2*	2,73 ± 0,2*
500 AUE	0,56 ± 0,03*	2,68 ± 0,02*	1,1 ± 0,2*	2,6 ± 0,3*

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

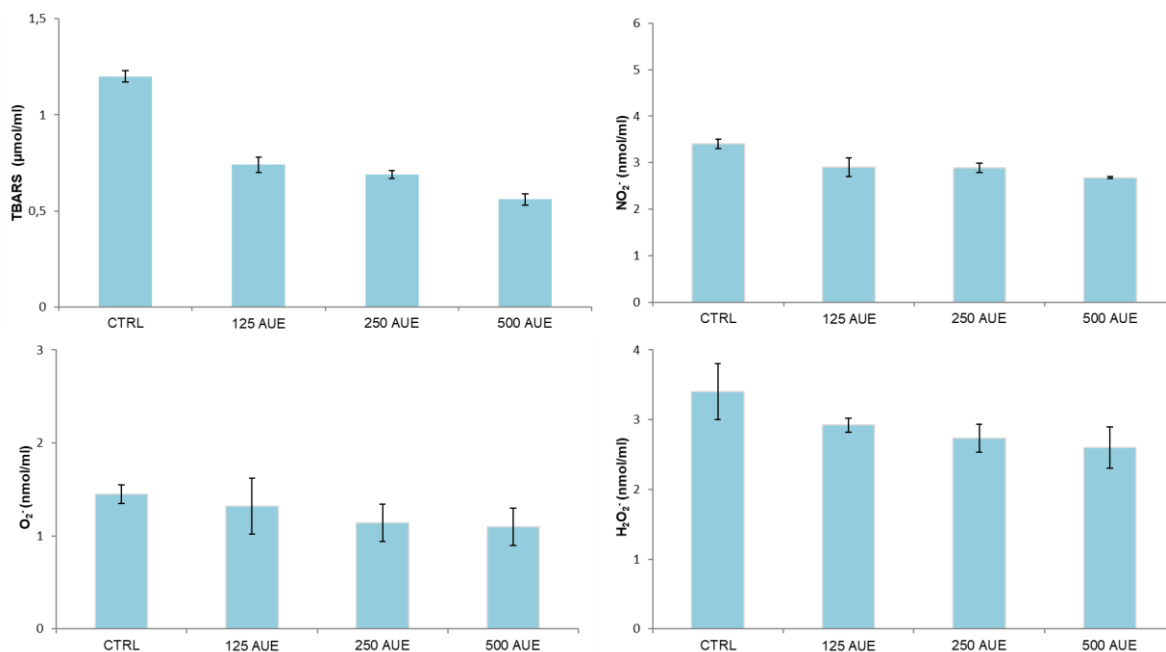


График 1. Прооксидациони параметри (TBARS, NO₂⁻, O₂⁻ и H₂O₂) одређивани у плазми здравих пацова који су били на третману екстрактима сремуша у дози од 500 mg/kg, 250 mg/kg и 125 mg/kg као и нетретираних здравих пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X±SD).

4.5.1.2. Ефекти екстраката сремуша на антиоксидационе параметре из крви здравих пацова

Из узорака еритроцита пацова који су били третирани екстрактом сремуша одређиване су вредности антиоксидационих параметара: SOD, CAT и GSH. Вредности параметара након примене екстракта у три дозе (500 mg/kg, 250 mg/kg и 125 mg/kg) као и нетретираних пацова приказане су табеларно и графички (Табела 12, График 2).

Вредности параметара су изражене као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$) са статистички значајном разликом за вредност $p < 0,05$.

Примена екстракта сремуша у највишој дози успела је да доведе до статистички значајног повећања вредности SOD у односу на контролне услове, док је примена у најнижој дози довела до значајног скока у вредности CAT. Параметар GSH није се значајно мењао под утицајем екстракта сремуша у све три дозе.

Табела 12. Ефекти конзумације екстраката сремуша на антиоксидационе параметре (SOD, CAT и GSH) мерене у лизату еритроцита здравих животиња

	SOD (U/g Hb x 10 ³)	CAT (U/g Hb x 10 ³)	GSH (nmol/ml RBC)
CTRL	17,2 \pm 1,8	7,9 \pm 0,4	87600 \pm 3456
125 AUE	19,9 \pm 2,72	8,78 \pm 0,2*	91005 \pm 1289
250 AUE	21,2 \pm 1,2	8,6 \pm 0,3	92045 \pm 1467
500 AUE	2,2 \pm 1,9*	8,5 \pm 0,1	90778 \pm 1276

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 AUE.

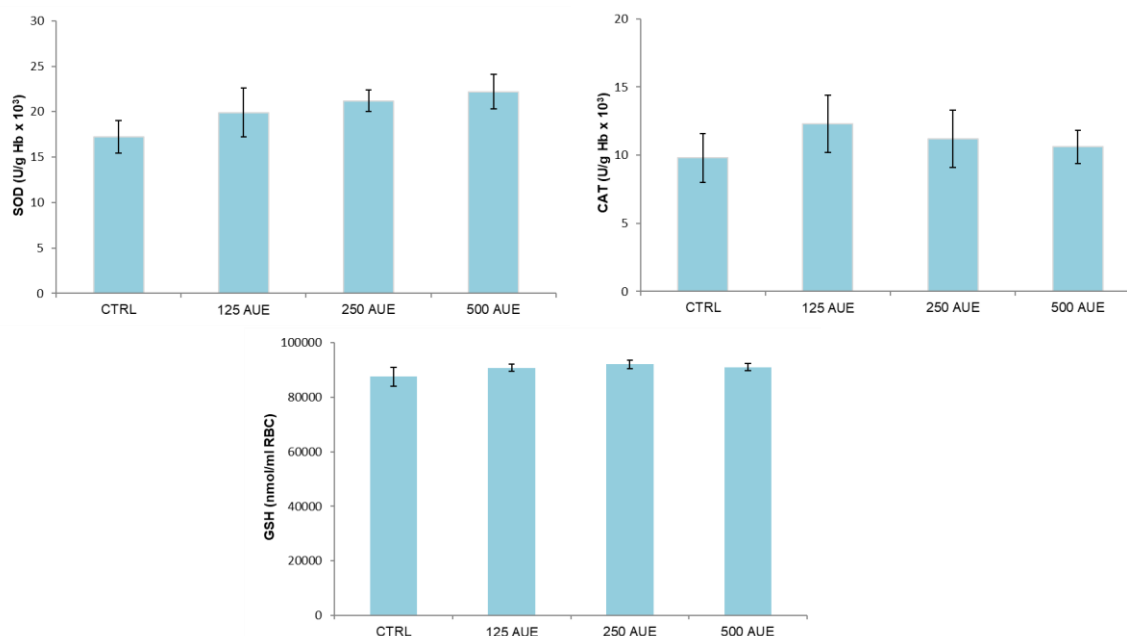


График 2. Антиоксидациони параметри (SOD, CAT и GSH) одређивани у лизату еритроцита здравих пацова који су били на третману екстрактима сремуша у дози од 500 mg/kg, 250 mg/kg и 125 mg/kg као и нетретираних здравих пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

4.5.2. Ефекти екстракта сремуша на системски редокс статус спонтано хипертензивних пацова

4.5.2.1. Ефекти екстракта сремуша на прооксидационе параметре из крви здравих пацова

Из узорака плазме пацова који су били третирани екстрактом сремуша одређиване су вредности прооксидационих параметара: TBARS, NO_2^- , O_2^- и H_2O_2 . Вредности параметара након примене екстракта у три дозе (500 mg/kg, 250 mg/kg и 125 mg/kg) као и нетретираних пацова приказане су табеларно и графички (Табела 13, График 3). Вредности параметара су изражене као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$) са статистички значајном разликом за вредност $p < 0,05$.

Табела 13. Ефекти конзумације екстракта сремуша на прооксидационе параметре (TBARS , NO_2^- , O_2^- и H_2O_2) у плазми спонтано хипертензивних животиња

	TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	NO_2^- (nmol/ml)	O_2^- (nmol/ml)	H_2O_2 (nmol/ml)
SHR	$1,7 \pm 0,2$	$4,8 \pm 0,23$	$2,8 \pm 0,12$	$4,9 \pm 0,11$
H125 AUE	$1,56 \pm 0,1^{\#}$	$4,3 \pm 0,3^{\#}$	$2,65 \pm 0,19$	$4,45 \pm 0,4^{\#}$
H250 AUE	$1,34 \pm 0,04^*$	$3,87 \pm 0,2^*$	$2,44 \pm 0,34$	$4,27 \pm 0,2$
H500 AUE	$1,06 \pm 0,02^*$	$3,67 \pm 0,1^*$	$2,32 \pm 0,32$	$3,92 \pm 0,18^*$

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 H500 AUE.

Примена екстракта сремуша у дози од 500 mg/kg довела је до смањења скоро свих мерених прооксиданаса изузев O_2^- у односу на нетретиране хипертензивне животиње. Доза екстракта од 250 mg/kg била је повезана са статистички значајним смањењем вредности TBARS и NO_2^- , док је најнижа доза довела до пада у концентрацији H_2O_2 . Ниже вредности TBARS, NO_2^- и H_2O_2 биле су детектоване у групи пацова на третману највишом у односу на најнижу дозу екстракта сремуша.

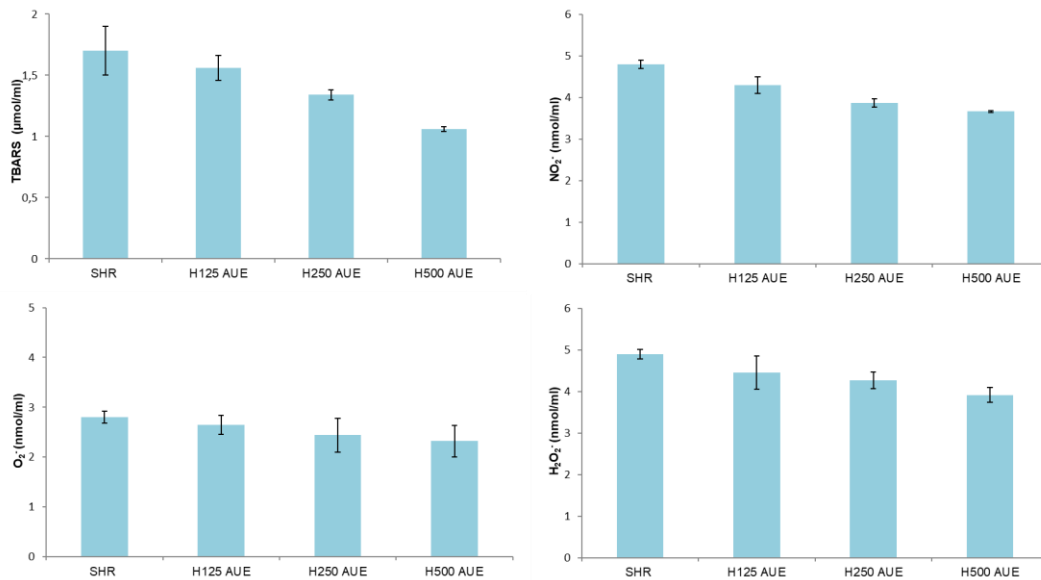


График 3. Прооксидациони параметри (TBARS, NO₂⁻, O₂⁻ и H₂O₂) одређивани у плазми спонтано хипертензивних пацова који су били на третману екстрактима сремуша у дози од 500 mg/kg, 250 mg/kg и 125 mg/kg као и нетретираних спонтано хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X±SD).

4.5.2.2. Ефекти екстракта сремуша на антиоксидационе параметре из крви спонтано хипертензивних пацова

Из узорака еритроцита пацова који су били третирани екстрактом сремуша одређиване су вредности антиоксидационих параметара: SOD, CAT и GSH. Вредности параметара након примене екстракта у три дозе (500 mg/kg, 250 mg/kg и 125 mg/kg) као и нетретираних пацова приказане су табеларно и графички (Табела 14, График 4). Вредности параметара су изражене као средња вредност ± стандардна девијација (X±SD) са статистички значајном разликом за вредност $p < 0,05$.

Након четворонедељног уноса екстракта сремуша у дози од 500 mg/kg уочено је статистички значајно повећање ензима SOD у односу на контролне услове, тј. хипертензивне нетретиране пацове и пацове који су били на третману најнижом дозом. Није дошло до значајних промена у вредностима CAT и GSH након примене екстракта сремуша.

Табела 14. Ефекти конзумације екстракта сремуша на антиоксидационе параметре (SOD, CAT и GSH) мерене у лизату еритроцита спонтано хипертензивних животиња

	SOD (U/g Hb x 10 ³)	CAT (U/g Hb x 10 ³)	GSH (nmol/ml RBC)
SHR	13,2 ± 1,1	6,5 ± 0,1	85404 ± 1345
H125 AUE	14,5 ± 1,7 #	6,8 ± 0,3	86178 ± 1234
H250 AUE	15,6 ± 1,4	6,9 ± 0,6	87899 ± 1457
H500AUE	17,8 ± 1,01*	7,3 ± 0,8	92002 ± 2469

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 H500 AUE.

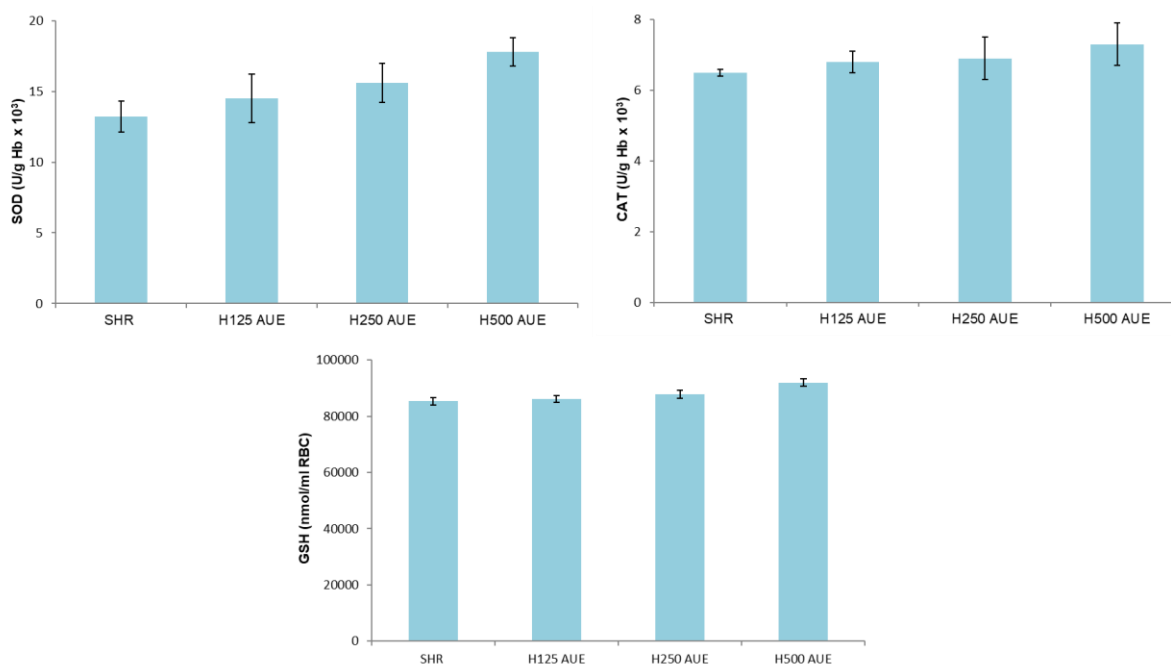


График 4. Антиоксидациони параметри (SOD, CAT и GSH) одређивани у лизату еритроцита спонтано хипертензивних пацова који су били на третману екстрактима сремуша у дози од 500 mg/kg, 250 mg/kg и 125 mg/kg као и нетретираних спонтано хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна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

4.6. Утицај екстракта сремуса на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

4.6.1. Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока нетретираних здравих и хипертензивних пацова

Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока приказане су табеларно и графички (Табела 15, График 5). Приказано је поређење вредности параметара унутар група CTRL и SHR, као и између група у тачкама C, P1 и P7.

У групи CTRL и SHR сви параметри били су значајно снижени на крају реперфузије у односу на период стабилизације. Додатно, код већине параметара вредности у последњем тренутку реперфузије биле су више у односу на први минут.

Табела 15. Кардиодинамски параметри у групи здравих и хипертензивних нетретираних пацова

		dp/dt max(mmHg)	dp/dt min(mmHg)	SLVP(mmHg)
CTRL	C	2120,8 ± 157,16	-1571,26 ± 110,3	72,3 ± 4,5
	P1	2300,8 ± 201,6	-1715,24 ± 53,4	61,2 ± 6,5
	P7	1780,7 ± 130,5 ^{a,b}	-914,8 ± 30,2 ^{a,b}	47,2 ± 6,8 ^{a,b}
SHR	C	1983,8 ± 220,1*	-1231,9 ± 82,2*	59,6 ± 2,8*
	P1	1815,8 ± 115*	-1382,19 ± 79,6*	45,6 ± 4,1*
	P7	1622,2 ± 112,2 ^{a,b}	-990,1 ± 56,3 ^{a,b}	38,9 ± 3,2 ^{a,*}
		DLVP(mmHg)	HR(bpm)	CF(mL/min)
CTRL	C	1,5 ± 0,18	289,2 ± 21,2	8,6 ± 0,4
	P1	1,2 ± 0,12	294 ± 32,3	8,4 ± 0,12
	P7	1,1 ± 0,17 ^a	267,1 ± 21,2 ^{a,b}	5,6 ± 0,13 ^{a,b}
SHR	C	1,3 ± 0,16	256,7 ± 19,2*	7,8 ± 0,67
	P1	1,4 ± 0,13	245,3 ± 18,2*	7,6 ± 0,32
	P7	0,99 ± 0,06 ^{a,b}	209,3 ± 19,9 ^{a,b,*}	6,13 ± 0,4 ^{a,b}

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X±SD). C - стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - тридесети минут реперфузије; ^aСтатистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку C унутар групе; ^bСтатистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку P1 унутар групе.*Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 између групе CTRL и SHR у тачки од интереса.

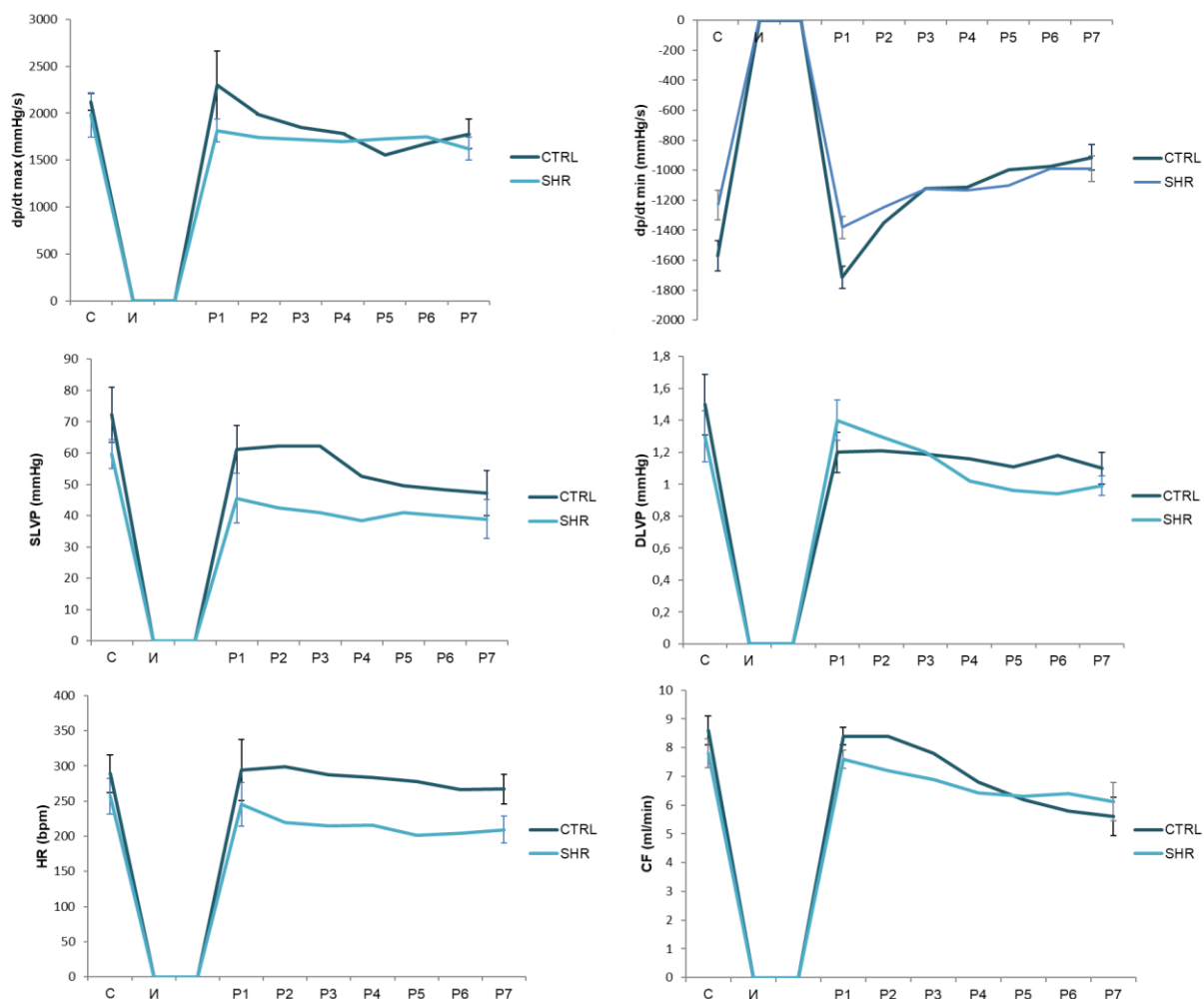


График 5. Кардиодинамски параметри у групи здравих и спонтано хипертензивних нетретираних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). С - стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - тридесети минут реперфузије;

4.6.2. Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока изолованог срца здравих пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 125 mg/kg

Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока приказане су табеларно и графички (Табела 16, График 6). Приказано је поређење вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока унутар групе на третману екстрактом у дози 125 mg/kg, као и вредности у датим тачкама од интереса између третиране и контролне групе.

У групи третираној екстрактом сремуша у најнижој дози вредности свих параметара изузев DLVP и SLVP се нису значајно мењале током периода исхемије и реперфузије. Вредност DLVP и SLVP је значајно пала на крају реперфузије у односу на период стабилизације и први минут реперфузије.

Када се упореде вредности између третираних и нетретираних животиња уочава се статистички значајно повећање dp/dt min, SLVP и CF на крају реперфузије код пацова који су конзумирали екстракт сремуша. С друге стране, почетне вредности dp/dt max су биле статистички значајно више у контролној групи. Такође, у последњој тачки реперфузије DLVP је био нижи у третираној групи.

Табела 16. Кардиодинамски параметри у групи здравих пацова на третману екстрактном сремуша у најнижој дози од 125 mg/kg

		dp/dt max(mmHg)	dp/dt min(mmHg)	SLVP(mmHg)
CTRL	C	2120,8 ± 157,16	-1571,26 ± 110,3	72,3 ± 4,5
	P1	2300,8 ± 201,6	-1715,24 ± 53,4	61,2 ± 6,5
	P7	1780,7 ± 130,5	-914,8 ± 30,2	47,2 ± 6,8
125 AUE	C	1800,2 ± 110,3*	- 1671,2 ± 18,2	72,1 ± 10,88
	P1	1912,3 ± 230*	- 1578,3 ± 78,5	73,4 ± 5,2
	P7	1879,2 ± 108,2	-1456,4 ± 57,8*	60,1 ± 7,8 ^{a,b*}
		DLVP(mmHg)	HR(bpm)	CF(mL/min)
CTRL	C	1,5 ± 0,18	289,2 ± 21,2	8,6 ± 0,4
	P1	1,2 ± 0,12	294 ± 32,3	8,4 ± 0,12
	P7	1,1 ± 0,17	267,1 ± 21,2	5,6 ± 0,13
125 AUE	C	1,4 ± 0,01	271,3 ± 29,7	7,5 ± 0,08
	P1	1,25 ± 0,02	274,2 ± 41,5	8,1 ± 0,12
	P7	0,99 ± 0,04 ^{a,b*}	261,2 ± 29,6	7,2 ± 0,7*

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X±SD). C - стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - тридесети минут реперфузије; ^aСтатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку C унутар групе; ^bСтатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку P1 унутар групе.*Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе CTRL и 125 AUE у тачки од интереса.

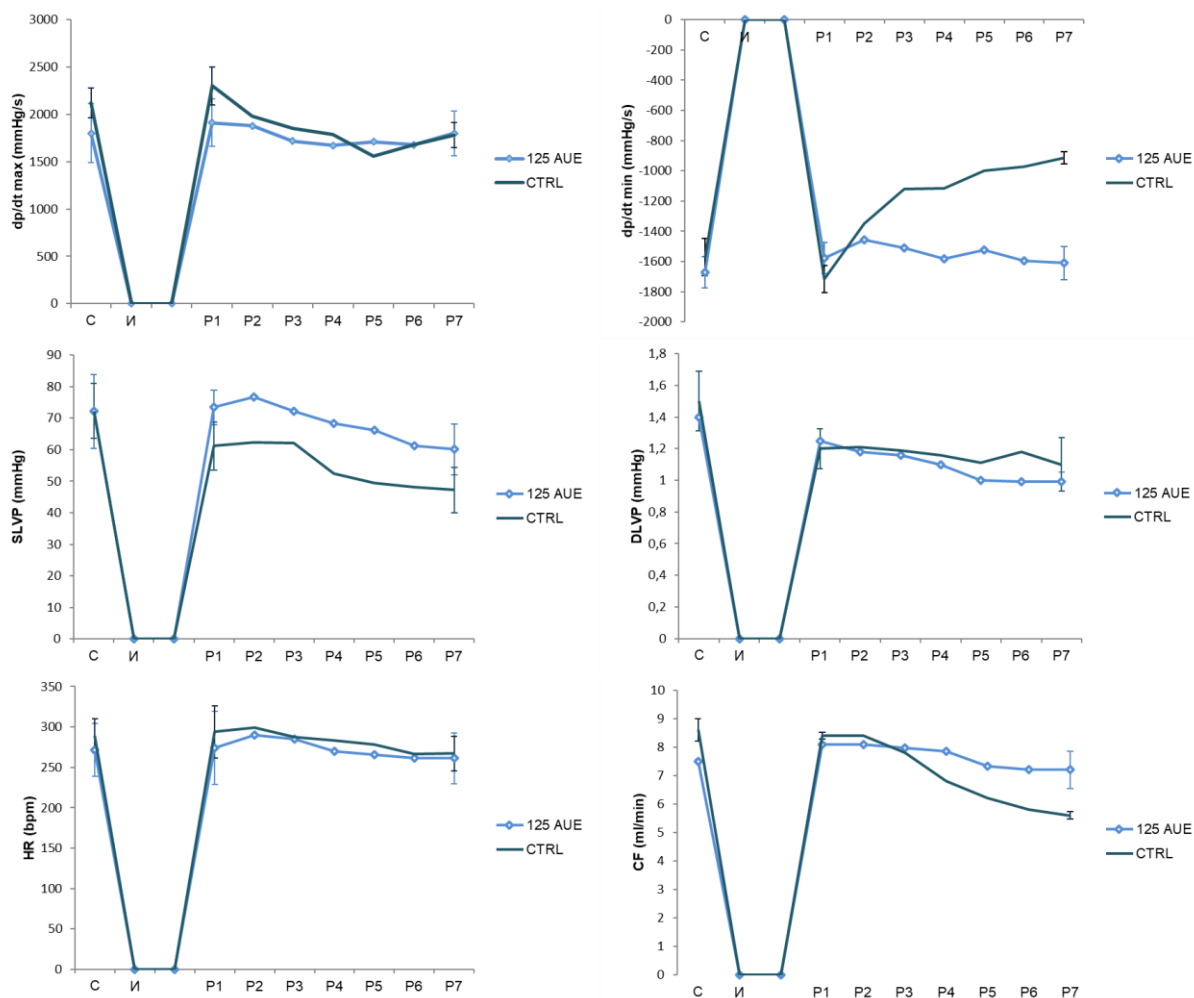


График 6. Кардиодинамски параметри у групи здравих пацова на третману екстрактном сремуша у дози од 125 mg/kg и здравих нетретираних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). C - стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - тридесети минут реперфузије;

4.6.3. Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока изолованог срца здравих пацова на третману екстрактном сремуша у дози од 250 mg/kg

Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока приказане су табеларно и графички (Табела 17, График 7). Приказано је поређење вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока унутар групе на третману екстрактном у дози 250 mg/kg, као и вредности у датим тачкама од интереса између третиране и контролне групе.

Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока нису се значајно мењале током експерименталног периода, односно између тачака стабилизације, првог и последњег минута реперфузије у групи пацова на третману екстрактном у средњој дози. Међутим, вредности dp/dt min, SLVP и CF су биле значајно више у групи на

третману екстрактом у дози 250 mg/kg на крају реперфузионог периода у односу на пацове без третмана.

Табела 17. Кардиодинамски параметри у групи здравих пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 250 mg/kg

		dp/dt max(mmHg)	dp/dt min(mmHg)	SLVP(mmHg)
CTRL	C	2120,8 ± 157,16	-1571,26 ± 110,3	72,3 ± 4,5
	P1	2300,8 ± 201,6	-1715,24 ± 53,4	61,2 ± 6,5
	P7	1780,7 ± 130,5	-914,8 ± 30,2	47,2 ± 6,8
250 AUE	C	1920,5 ± 72,8	- 1671,8 ± 209,1	68,7 ± 2,4
	P1	2005,6 ± 124,5	-1567,6 ± 112,3	71,2 ± 7,2*
	P7	1890,5 ± 132,3	-1550,2 ± 131,2*	59,8 ± 3,8*
		DLVP(mmHg)	HR(bpm)	CF(mL/min)
CTRL	C	1,5 ± 0,18	289,2 ± 21,2	8,6 ± 0,4
	P1	1,2 ± 0,12	294 ± 32,3	8,4 ± 0,12
	P7	1,1 ± 0,17	267,1 ± 21,2	5,6 ± 0,13
250 AUE	C	1,37 ± 0,1	272,5 ± 21,4	7,4 ± 0,89
	P1	1,28 ± 0,01	282,6 ± 30,6	8,1 ± 0,4
	P7	1,23 ± 0,04	267,9 ± 35,8	7,34 ± 0,9*

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X±SD). C - стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - тридесети минут реперфузије; ^aСтатистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку C унутар групе; ^bСтатистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку P1 унутар групе.*Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 између групе CTRL и 250 AUE у тачки од интереса.

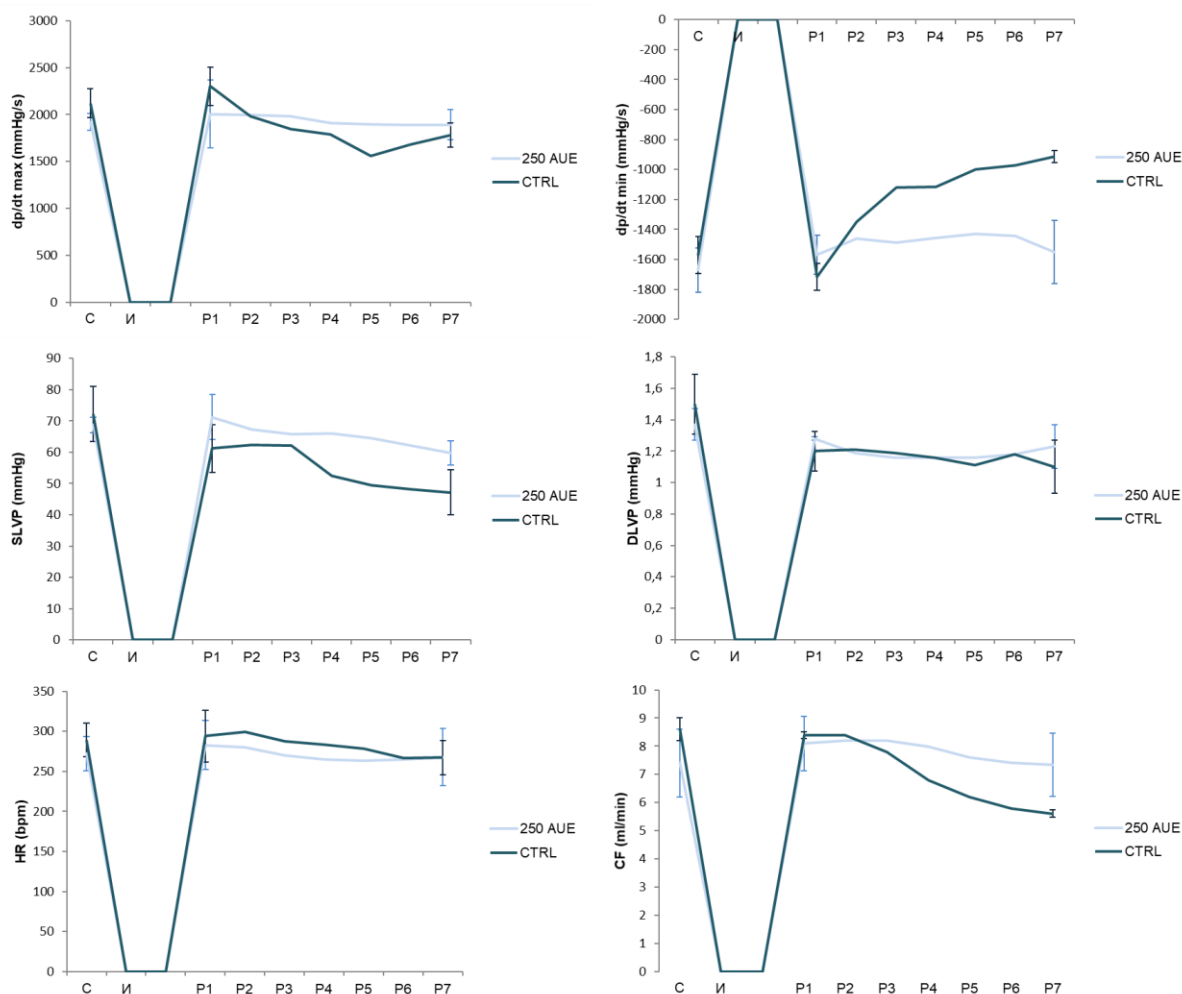


График 7. Кардиодинамски параметри у групи здравих пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 250 mg/kg и здравих нетретираних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). С - стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - тридесети минут реперфузије;

4.6.4. Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока изолованог срца здравих пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 500 mg/kg

Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока приказане су табеларно и графички (Табела 18, График 8). Приказано је поређење вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока унутар групе на третману екстрактом у дози 500 mg/kg, као и вредности у датим тачкама од интереса између третиране и контролне групе.

У групи пацова која је била на третману екстрактом сремуша у највишој дози дошло је до скока у параметру dp/dt max и пада DLVP у последњем минуту реперфузије у односу на тачку стабилизације. Такође уочено је статистички значајно смањење CF на крају реперфузије у односу на први минут.

Вредности свих параметара изузев DLVP на крају реперфузије биле су више у третираној у односу на контролну групу. Додатно, dp/dt min, SLVP и CF били су виши у првом минуту реперфузије у групи која је конзумирала сремуш у односу на контролне пацове.

Табела 18. Кардиодинамски параметри у групи здравих пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 500 mg/kg

		dp/dt max(mmHg)	dp/dt min(mmHg)	SLVP(mmHg)
CTRL	C	2120,8 ± 157,16	-1571,26 ± 110,3	72,3 ± 4,5
	P1	2300,8 ± 201,6	-1715,24 ± 53,4	61,2 ± 6,5
	P7	1780,7 ± 130,5	-914,8 ± 30,2	47,2 ± 6,8
500 AUE	C	1989,2 ± 231,4	- 1588,3 ± 78,4	78,6 ± 3,1
	P1	2001,3 ± 132,3*	- 1526,5 ± 88,4*	81,4 ± 3,2 *
	P7	2129,3 ± 129,3 ^{a*}	- 1612,95 ± 72,3*	85,8 ± 5,6*
		DLVP(mmHg)	HR(bpm)	CF(mL/min)
CTRL	C	1,5 ± 0,18	289,2 ± 21,2	8,6 ± 0,4
	P1	1,2 ± 0,12	294 ± 32,3	8,4 ± 0,12
	P7	1,1 ± 0,17	267,1 ± 21,2	5,6 ± 0,13
500 AUE	C	1,31 ± 0,1	275,6 ± 27,1	9,2 ± 1,3
	P1	1,28 ± 0,12	283,4 ± 22,1	10,2 ± 0,6*
	P7	1,12 ± 0,09 ^a	285,7 ± 17,4*	8,4 ± 0,8 ^{b*}

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X±SD). C - стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - тридесети минут реперфузије; ^aСтатистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку C унутар групе; ^bСтатистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку P1 унутар групе.*Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 између групе CTRL и 500 AUE у тачки од интереса.

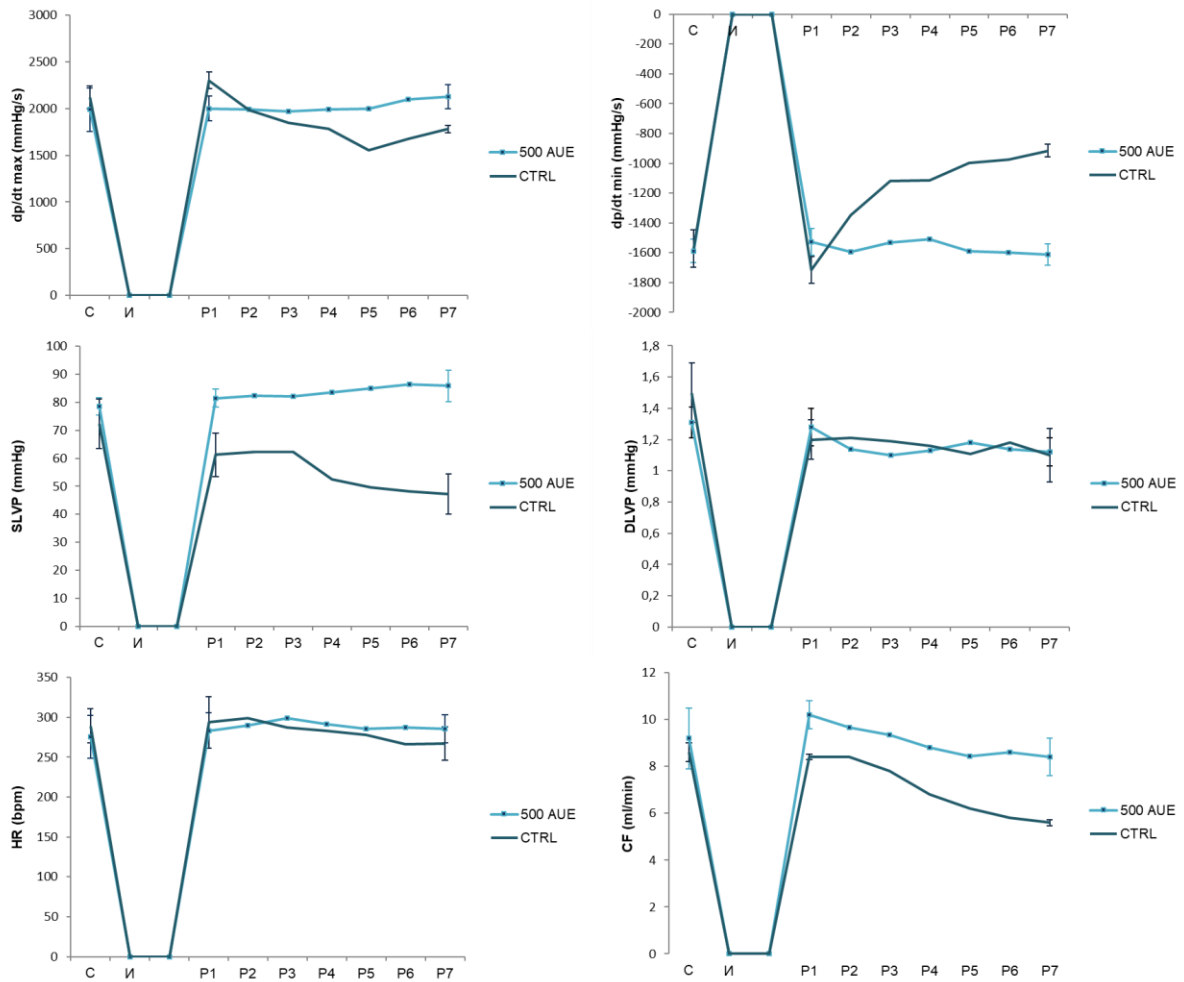


График 8. Кардиодинамски параметри у групи здравих пацова на третману екстрактном сремуша у дози од 500 mg/kg и здравих нетретираних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). С - стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - тридесети минут реперфузије;

4.6.5. Поређење ефеката растућих доза екстракта сремуша на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца здравих пацова

Разлике у ефектима растућих доза екстракта сремуша на кардиодинамске параметре и коронарни проток код здравих животиња приказане су приказане су табеларно и графички (Табела 19, График 9).

Вредности dp/dt max и SLVP биле су значајно више на крају реперфузије у групи пацова на третману највишом дозом у односу на остале две примењене дозе екстракта. Параметар dp/dt min имао је сличне вредности након примене све три дозе екстракта. Додатно, значајно више вредности DLVP уочене су након примене средње дозе у односу на највишу и најнижу у последњем моменту реперфузије и највише у односу на најнижу дозу. Статистички значајно повећање HR забележено је након примене највише дозе у односу на остале у првом и последњем минуту реперфузије, а исти тренд уочен је и код параметра CF само по завршетку реперфузије.

Табела 19. Разлике у ефектима конзумације растућих доза екстракта сремуша на кардиодинамске параметре и коронарни проток код здравих пацова

		dp/dt max(mmHg)	dp/dt min(mmHg)	SLVP(mmHg)
125 vs 250 AUE	C	p>0,05	p>0,05	p>0,05
	P1	p>0,05	p>0,05	p>0,05
	P7	p>0,05	p>0,05	p>0,05
250 vs 500 AUE	C	p>0,05	p>0,05	p>0,05
	P1	p>0,05	p>0,05	p>0,05
	P7	p<0,05	p>0,05	p<0,05
125 vs 500 AUE	C	p<0,05	p>0,05	p<0,05
	P1	p>0,05	p>0,05	p>0,05
	P7	p<0,05	p>0,05	p<0,05
		DLVP(mmHg)	HR(bpm)	CF(mL/min)
125 vs 250 AUE	C	p>0,05	p>0,05	p>0,05
	P1	p>0,05	p>0,05	p>0,05
	P7	p<0,05	p>0,05	p>0,05
250 vs 500 AUE	C	p>0,05	p<0,05	p>0,05
	P1	p>0,05	p>0,05	p>0,05
	P7	p<0,05	p<0,05	p<0,05
125 vs 500 AUE	C	p>0,05	p<0,05	p>0,05
	P1	p>0,05	p>0,05	p>0,05
	P7	p<0,05	p<0,05	p<0,05

p<0,05 указује на статистички значајну разлику када се пореде вредности здравих пацова на третману растућим дозама екстракта.

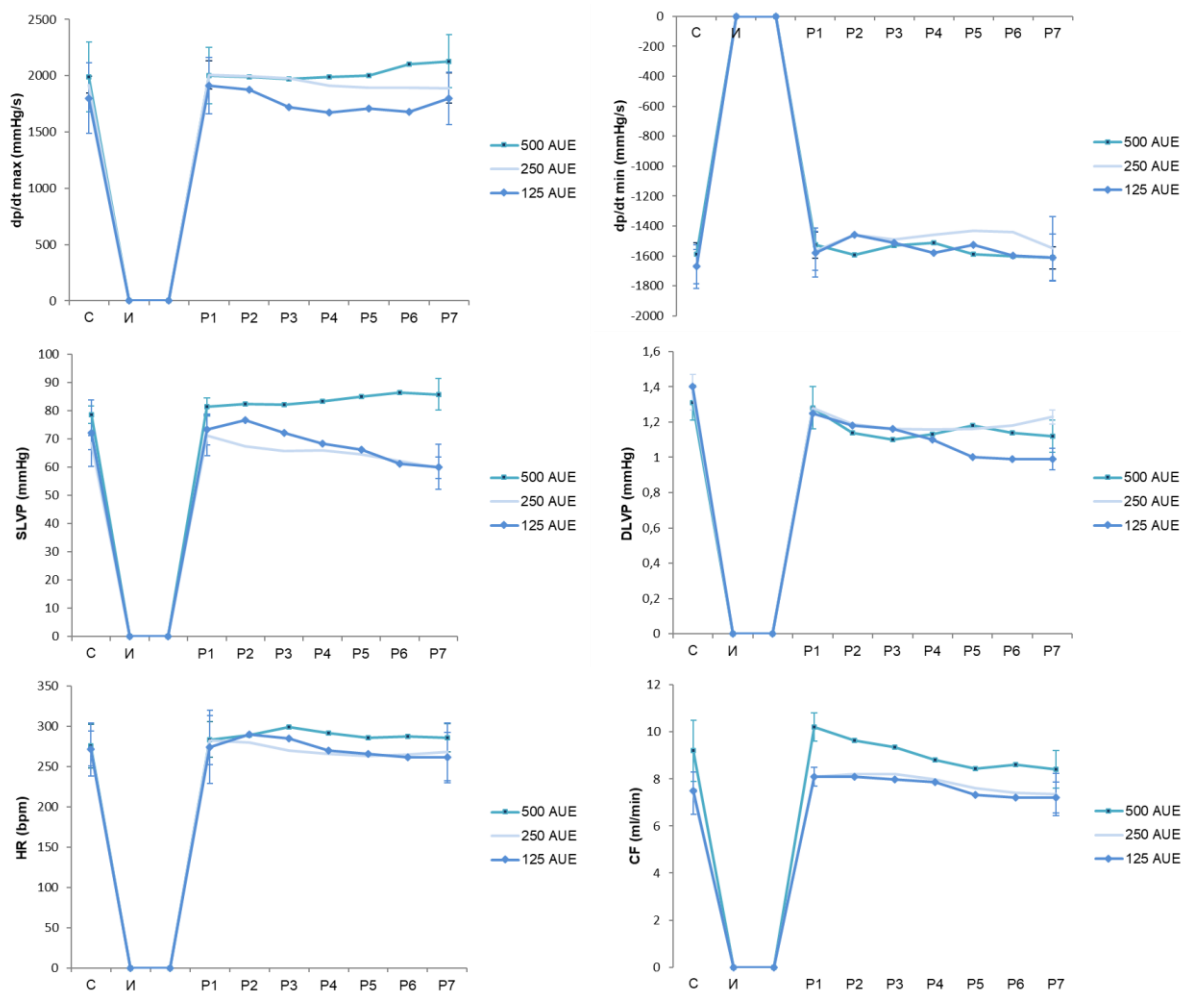


График 9. Ефекти конзумације растућих доза екстракта сремуша на кардиодинамске параметре и коронарни проток ($dp/dt \max$, $dp/dt \min$, SLVP, DLVP, HR и CF) код здравих пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

4.6.7. Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока изолованог срца спонтано хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 125 mg/kg

Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока приказане су табеларно и графички (Табела 20, График 10). Приказано је поређење вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока унутар групе на третману екстрактом у дози 125 mg/kg, као и вредности у датим тачкама од интереса између третиране и контролне групе спонтано хипертензивних пацова.

У групи на третману најнижом дозом екстракта сремуша забележен је значајан пад SLVP и CF на крају реперфузије у односу на период стабилизације. Вредност HR је била нижа у P7 у односу на P1. У групи на третману екстрактом у односу на нетретиране пацове вредност $dp/dt \max$ била је виша у P1 и P7, $dp/dt \min$, DLVP и CF у P7, док су SLVP и HR били нижи у стабилизацији.

Табела 20. Кардиодинамски параметри у групи спонтано хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 125 mg/kg

		dp/dt max(mmHg)	dp/dt min(mmHg)	SLVP(mmHg)
SHR	C	1983,8 ± 220,1	-1231,9 ± 82,2	59,6 ± 2,8
	P1	1815,8 ± 115	-1382,19 ± 79,6	45,6 ± 4,1
	P7	1622,2 ± 112,2	-990,1 ± 56,3	38,9 ± 3,2
H125 AUE	C	1914,5 ± 43,2	-1301,3 ± 132,4	40,1 ± 2,4*
	P1	2003,4 ± 142,2*	- 1379,9 ± 110,2	39,8 ± 3,5
	P7	1980,2 ± 123,2*	-1292,4 ± 87,6*	31,9 ± 4,1 ^a
		DLVP(mmHg)	HR(bpm)	CF(mL/min)
SHR	C	1,3 ± 0,16	256,7 ± 19,2	7,8 ± 0,67
	P1	1,4 ± 0,13	245,3 ± 18,2	7,6 ± 0,32
	P7	0,99 ± 0,06	209,3 ± 19,9	6,13 ± 0,4
H125 AUE	C	1,1 ± 0,01	230,1 ± 10,5*	7,34 ± 0,1
	P1	1,13 ± 0,02	241,2 ± 34	7,27 ± 0,5
	P7	1,15 ± 0,05*	220,1 ± 9,2 ^b	7,06 ± 0,4 ^{a*}

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X±SD). C - стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - тридесети минут реперфузије; ^aСтатистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку C унутар групе; ^bСтатистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку P1 унутар групе.*Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 између групе SHR и H125 AUE у тачки од интереса.

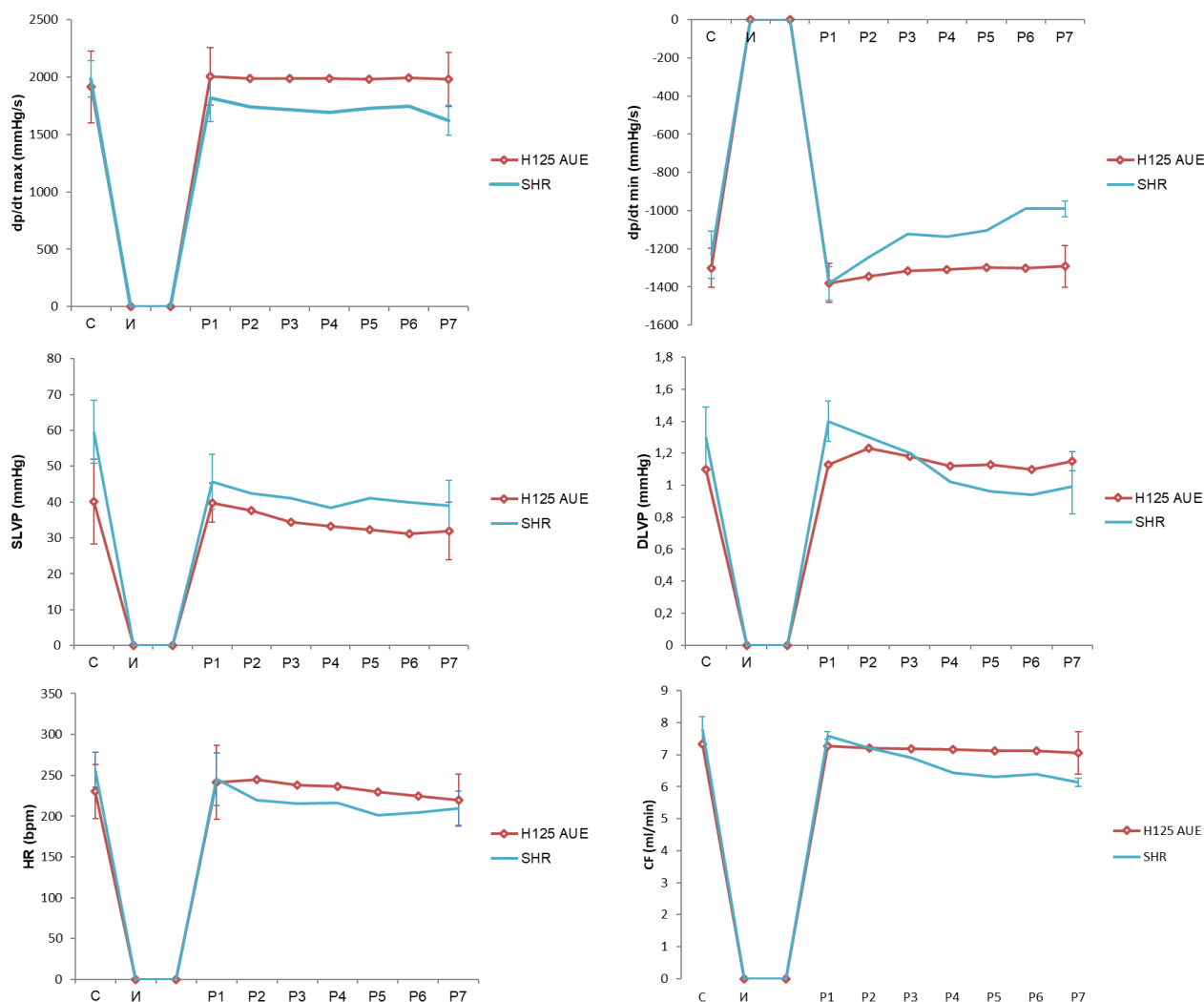


График 10. Кардиодинамски параметри у групи хипертензивних пацова на третману екстрактном сремуса у дози од 125 mg/kg и хипертензивних нетретираних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). C - стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - тридесети минут реперфузије;

4.6.8. Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока изолованог срца хипертензивних пацова на третману екстрактном сремуса у дози од 250 mg/kg

Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока приказане су табеларно и графички (Табела 21, График 11). Приказано је поређење вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока унутар групе на третману екстрактном у дози 250 mg/kg, као и вредности у датим тачкама од интереса између третиране и контролне групе спонтано хипертензивних пацова.

У групи која је била на третману средњом дозом екстракта дошло је до статистички значајног смањења вредности dp/dt max на крају реперфузиј у односу на

први минут. Такође, вредности SLVP и CF биле су значајно ниже на крају реперфузије у односу на период стабилизације.

У групи на третману уочене су значајно више вредности dp/dt min и HR на крају реперфузије, ниже вредности SLVP у тачки С и DLVP у тачкама С и P1.

Табела 21. Кардиодинамски параметри у групи спонтано хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 250 mg/kg

		dp/dt max(mmHg)	dp/dt min(mmHg)	SLVP(mmHg)
SHR	C	1983,8 ± 220,1	-1231,9 ± 82,2	59,6 ± 2,8
	P1	1815,8 ± 115	-1382,19 ± 79,6	45,6 ± 4,1
	P7	1622,2 ± 112,2	-990,1 ± 56,3	38,9 ± 3,2
H250 AUE	C	1893,5 ± 110,4	-1245,8 ± 15,6	44,2 ± 1,4*
	P1	1913,2 ± 123,5	-1318,6 ± 45,6	41,6 ± 4,8
	P7	1789,6 ± 45,6 ^b	-1289,8 ± 75,4*	33,1 ± 2,7 ^a
		DLVP(mmHg)	HR(bpm)	CF(mL/min)
SHR	C	1,3 ± 0,16	256,7 ± 19,2	7,8 ± 0,67
	P1	1,4 ± 0,13	245,3 ± 18,2	7,6 ± 0,32
	P7	0,99 ± 0,06	209,3 ± 19,9	6,13 ± 0,4
H250 AUE	C	1,02 ± 0,01*	246,5 ± 12,3	7,32 ± 0,9
	P1	1,09 ± 0,05*	251,2 ± 14,5	7,1 ± 0,7
	P7	1,087 ± 0,04	237,3 ± 10*	6,47 ± 0,56 ^a

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X±SD). С - стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - тридесети минут реперфузије; ^aСтатистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку С унутар групе; ^bСтатистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку P1 унутар групе.*Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 између групе SHR и H250 AUE у тачки од интереса.

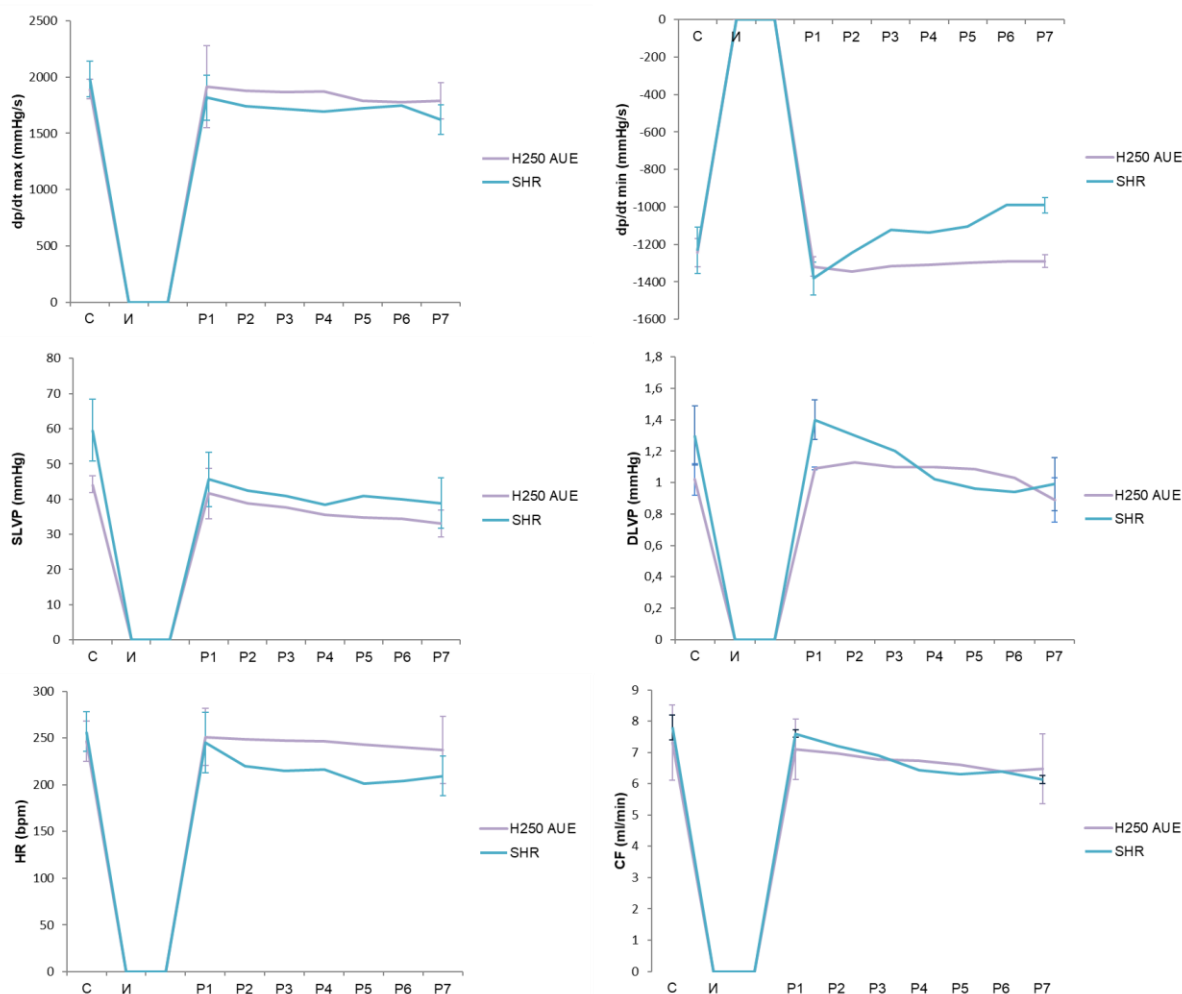


График 11. Кардиодинамски параметри у групи хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуса у дози од 250 mg/kg и хипертензивних нетретираних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). С - стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - тридесети минут реперфузије;

4.6.9. Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока изолованог срца хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуса у дози од 500 mg/kg

Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока приказане су табеларно и графички (Табела 22, График 12). Приказано је поређење вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока унутар групе на третману екстрактом у дози 500 mg/kg, као и вредности у датим тачкама од интереса између третираних и контролне групе спонтано хипертензивних пацова.

Посматрани кардиодинамски параметри и коронарни проток се нису значајно мењали у посматраним тренуцима времена у групи која је била на четворонедељном третману екстрактом сремуса у највишој дози. Вредности dp/dt max, dp/dt min, HR и

CF биле су значајно више у групи на третману екстрактом сремуша у дози од 500 mg/kg у односу на контролну групу пацова на крају реперфузије, док је вредност DLVP била виша у првом минуту реперфузије.

Табела 12. Кардиодинамски параметри у групи спонтано хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 500 mg/kg

		dp/dt max(mmHg)	dp/dt min(mmHg)	SLVP(mmHg)
SHR	C	1983,8 ± 220,1	-1231,9 ± 82,2	59,6 ± 2,8
	P1	1815,8 ± 115	-1382,19 ± 79,6	45,6 ± 4,1
	P7	1622,2 ± 112,2	-990,1 ± 56,3	38,9 ± 3,2
H500 AUE	C	1888,9 ± 45,3	-1332,4 ± 30,4	49,8 ± 4,2
	P1	1869,3 ± 83,2	-1411,6 ± 67,3	51,2 ± 5,6
	P7	1820 ± 10,1*	-1389,5 ± 81,3*	42,2 ± 2,1
		DLVP(mmHg)	HR(bpm)	CF(mL/min)
SHR	C	1,3 ± 0,16	256,7 ± 19,2	7,8 ± 0,67
	P1	1,4 ± 0,13	245,3 ± 18,2	7,6 ± 0,32
	P7	0,99 ± 0,06	209,3 ± 19,9	6,13 ± 0,4
H500 AUE	C	1,13 ± 0,01	249,4 ± 19,1	7,4 ± 1,1
	P1	1,14 ± 0,07*	261,2 ± 32,2	7,72 ± 0,67
	P7	1,09 ± 0,01	240,3 ± 14,5*	7,67 ± 1,14*

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X±SD). C - стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - тридесети минут реперфузије; ^aСтатистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку C унутар групе; ^bСтатистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку P1 унутар групе.*Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 између групе SHR и H500 AUE у тачки од интереса.

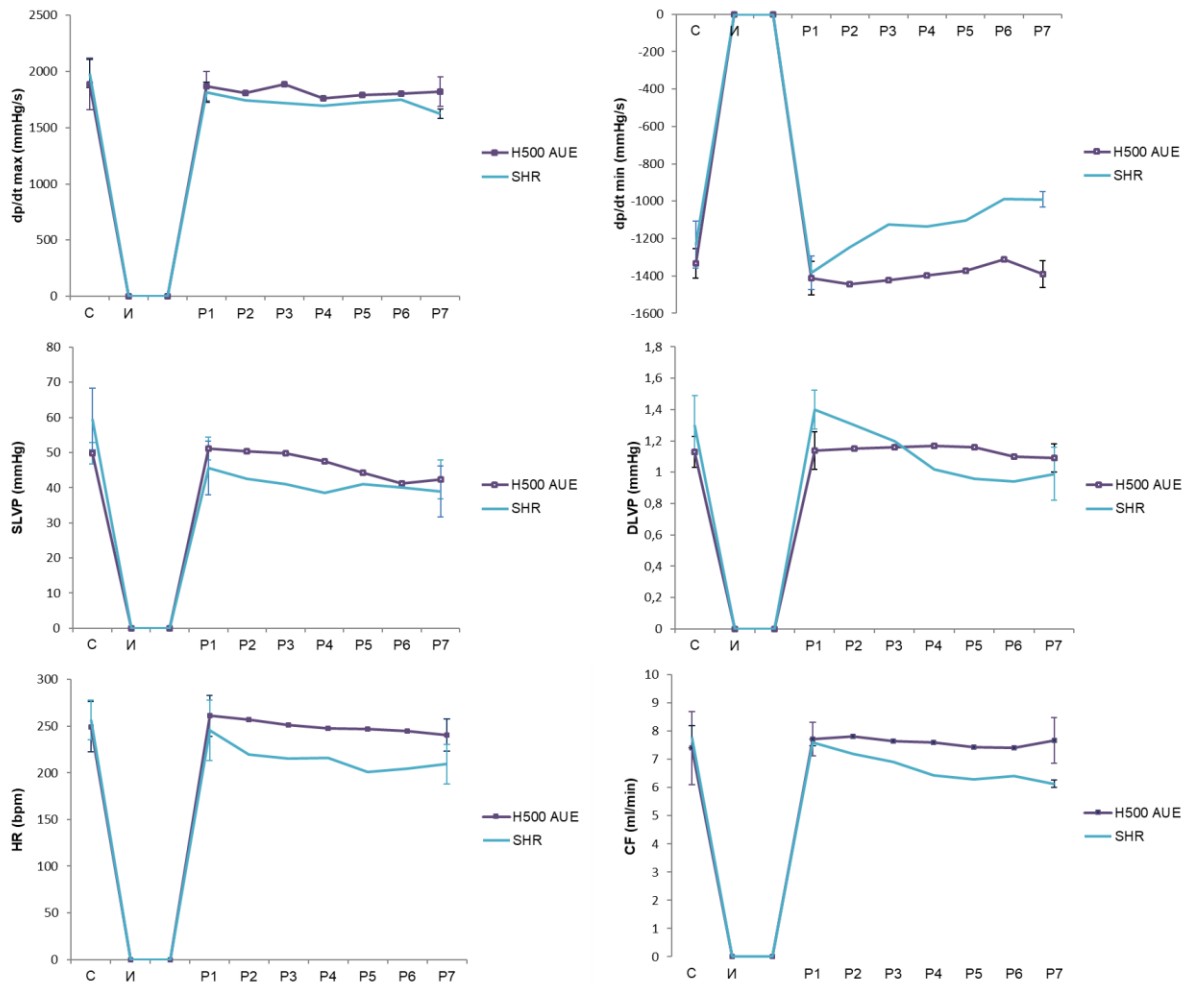


График 12. Кардиодинамски параметри у групи хипертензивних пацова на третману екстрактом сренуша у дози од 500 mg/kg и хипертензивних нетретираних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). C - стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - тридесети минут реперфузије;

4.6.10. Поређење ефеката растућих доза екстракта сремуша на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца спонтано хипертензивних пацова

Разлике у ефектима растућих доза екстракта сремуша на кардиодинамске параметре и коронарни проток код хипертензивних животиња приказане су приказане су табеларно и графички (Табела 23, График 13).

Табела 23. Разлике у ефектима конзумације растућих доза екстракта сремуша на кардиодинамске параметре и коронарни проток код хипертензивних пацова

		dp/dt max(mmHg)		dp/dt min(mmHg)	SLVP(mmHg)	
H125 AUE	vs	H250	C	p>0,05	p>0,05	p>0,05
			P1	p>0,05	p>0,05	p>0,05
			P7	p<0,05	p>0,05	p>0,05
H250 AUE	vs	H500	C	p>0,05	p>0,05	p>0,05
			P1	p>0,05	p>0,05	p>0,05
			P7	p>0,05	p>0,05	p<0,05
H125 AUE	vs	H500	C	p>0,05	p>0,05	p>0,05
			P1	p>0,05	p>0,05	p>0,05
			P7	p<0,05	p>0,05	p<0,05
		DLVP(mmHg)		HR(bpm)	CF(mL/min)	
H125 AUE	vs	H250	C	p>0,05	p>0,05	p>0,05
			P1	p>0,05	p>0,05	p>0,05
			P7	p<0,05	p>0,05	p>0,05
H250 AUE	vs	H500	C	p>0,05	p>0,05	p>0,05
			P1	p>0,05	p>0,05	p>0,05
			P7	p<0,05	p>0,05	p<0,05
H125 AUE	vs	H500	C	p>0,05	p>0,05	p>0,05
			P1	p>0,05	p>0,05	p>0,05
			P7	p>0,05	p>0,05	p>0,05

p<0,05 указује на статистички значајну разлику када се пореде вредности здравих пацова на третману растућим дозама екстракта.

Вредности dp/dt max биле су значајно више на крају реперфузије у групи пацова на третману најнижом дозом у односу на остале две примењене дозе екстракта. Параметар dp/dt min није се значајно разликовао између група. Значајно више вредности SLVP биле су у групи која је конзумирала највишу дозу у односу на остале примењене дозе у последњем моменту реперфузије. На крају реперфузије значајно ниже вредности DLVP уочене су код пацова који су користили средњу дозу у односу на остале дозе. Додатно, у последњем минути реперфузије вредност CF била је нижа у групи на третману средњом у односу на највишу дозу.

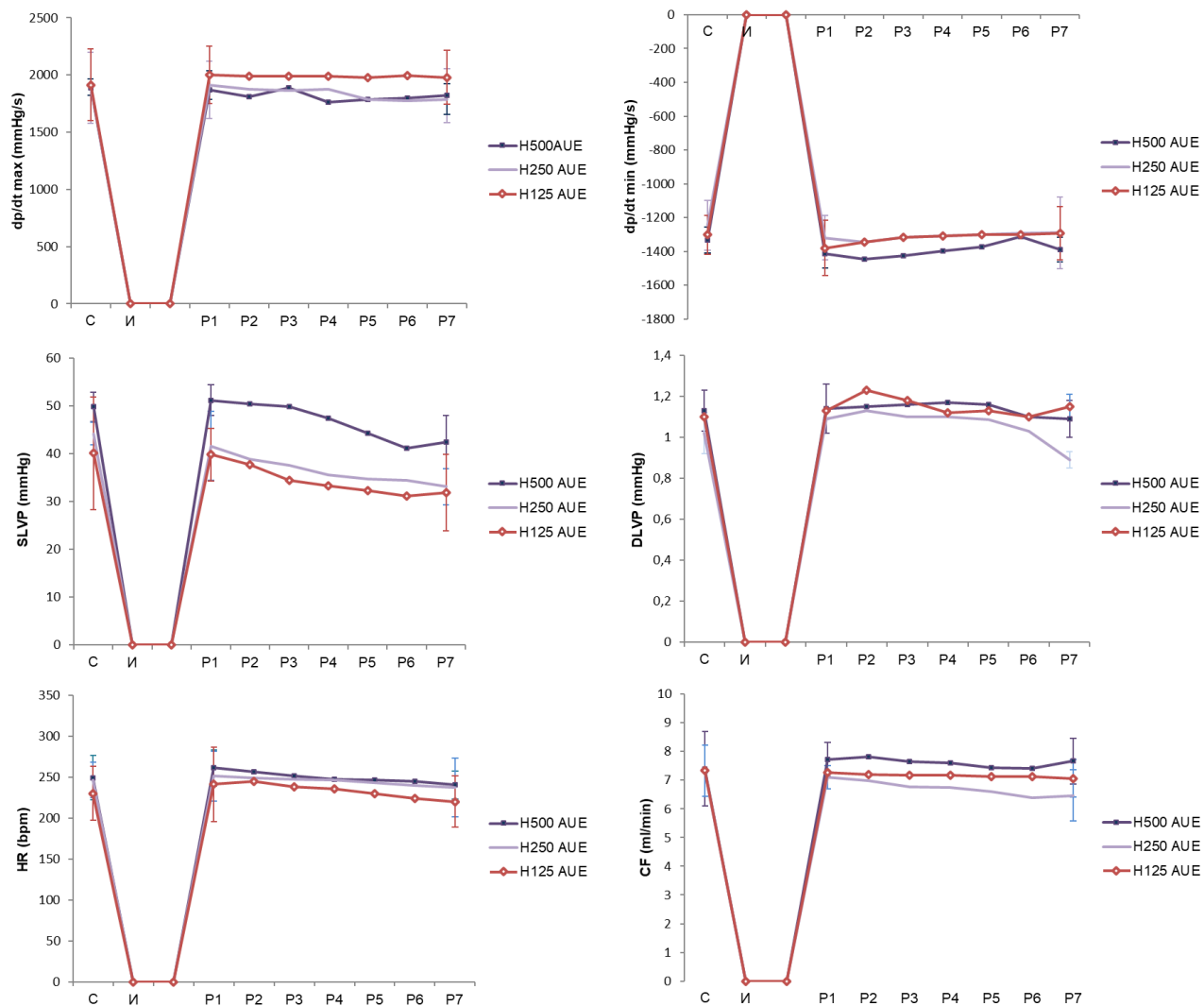


График 13. Ефекти конзумације растућих доза екстраката сремуша на кардиодинамске параметре и коронарни проток (dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP, HR и CF) спонтано хипертензивних пацова. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

4.7. Утицај екстракта сремуша на маркере оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента

4.7.1. Вредности маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента нетретираних здравих и хипертензивних пацова

Вредности маркера оксидационог стреса приказане су табеларно и графички (Табела 24, График 14). Приказане су разлике у вредностима прооксиданаса у тачкама од интереса у групи здравих и спонтано хипертензивних пацова, као и међусобна разлика између ове две групе у тренуцима С, P1 и P7.

У групи здравих пацова и спонтано хипертензивних пацова вредности свих мерених параметара биле су повишене значајно у P7 у односу на период стабилизације. У групи здравих животиња сви маркери изузев TBARS су на крају реперфузије били значајно повишени и у односу на први минут реперфузије. У групи хипертензивних пацова уочава се статистички значајан скок вредности NO_2^- на почетку реперфузије у односу на период стабилизације. Статистички значајно веће вредности TBARS у P1 и ниже вредности NO_2^- у P7 уочене су у групи спонтано хипертензивних пацова у односу на здраве.

Табела 14. Вредности маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента код нетретираних здравих и хипертензивних пацова

		TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	NO_2^- (nmol/ml)	O_2^- (nmol/ml)	H_2O_2 (nmol/ml)
CTRL	C	25,7 ± 1,3	95,2 ± 13,4	38,6 ± 1,2	48,7 ± 1,2
	P1	28,9 ± 1,2	97,8 ± 10,2	43,1 ± 1,2	49,3 ± 4,5
	P7	34,5 ± 2,4 ^a	108,1 ± 9,8 ^{a,b}	52,6 ± 4,4 ^{a,b}	55,4 ± 1,88 ^{a,b}
SHR	C	29,3 ± 1,8	92,7 ± 13,2	41,2 ± 1,2	53,4 ± 3,6
	P1	34,5 ± 2,1*	100,1 ± 12,18 ^a	43,4 ± 3,6	56,7 ± 4,1
	P7	36,7 ± 2,38 ^a	97,1 ± 12,7*	51,9 ± 2,58 ^a	63,8 ± 4,58 ^a

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). С - стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - тридесети минут реперфузије; ^aСтатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку С унутар групе; ^bСтатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку P1 унутар групе.*Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе CTRL и SHR у тачки од интереса.

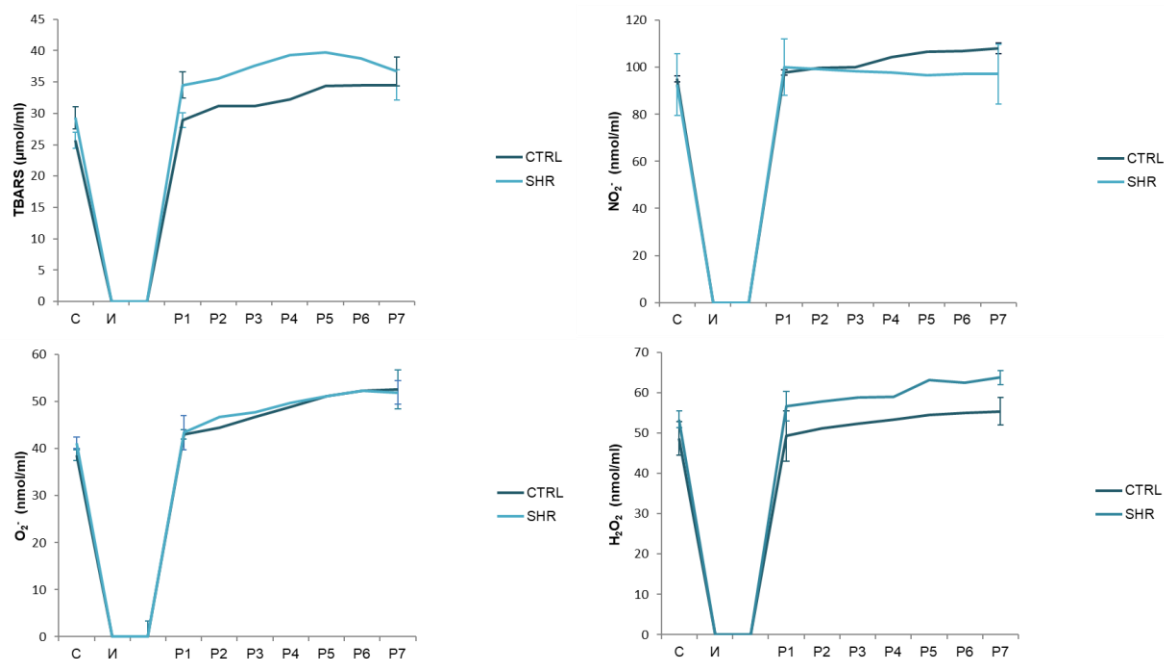


График 14. Вредности прооксидационих параметара (TBARS, NO₂⁻, O₂⁻ и H₂O₂) код zdravih и спонтано хипертензивних пацова без третмана. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X±SD).

4.7.2. Вредности маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента здравих пацова на третману екстрактом сремуса у дози од 125 mg/kg

Вредности маркера оксидационог стреса приказане су табеларно и графички (Табела 25, График 15). Приказане су вредности прооксиданаса у тачкама од интереса код пацова на третману екстрактом сремуса у дози од 125 mg/kg, као и разлика у вредностима параметара између третираних и нетретираних здравих пацова.

У групи здравих пацова на третману екстрактом сремуса у дози од 125 mg/kg откривене су статистички значајно повећане вредности TBARS на крају реперфузије у односу на стабилизацију. Такође, H₂O₂ је био повишен у првом минуту у односу на стабилизациони период.

На крају реперфузионог периода у групи на третману екстрактом уочава се значајно снижење свих маркера у односу на стабилизациони период. Додатно, вредност TBARS била је значајно нижа код третираних у односу на контролне пацове у првом минуту реперфузије.

Табела 25. Вредности маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента код пацова на третману екстрактном сремуша у дози од 125 mg/kg

		TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	NO_2^- (nmol/ml)	O_2^- (nmol/ml)	H_2O_2 (nmol/ml)
CTRL	C	25,7 \pm 1,3	95,2 \pm 13,4	38,6 \pm 1,2	48,7 \pm 1,2
	P1	28,9 \pm 1,2	97,8 \pm 10,2	43,1 \pm 1,2	49,3 \pm 4,5
	P7	34,5 \pm 2,4	108,1 \pm 9,8	52,6 \pm 4,4	55,4 \pm 1,88
125 AUE	C	22,9 \pm 1,11	88,4 \pm 1,6	41,2 \pm 5,6	46,2 \pm 1,2
	P1	23,4 \pm 1,19*	92,1 \pm 2,4	42,4 \pm 4,8	53,2 \pm 4,5 ^a
	P7	26,7 \pm 3,7 ^{a*}	92,3 \pm 3,7*	42,7 \pm 2,8*	48,4 \pm 4,8*

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). C - стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - тридесети минут реперфузије; ^aСтатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку C унутар групе; ^bСтатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку P1 унутар групе. *Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе CTRL и 125 AUE у тачки од интереса.

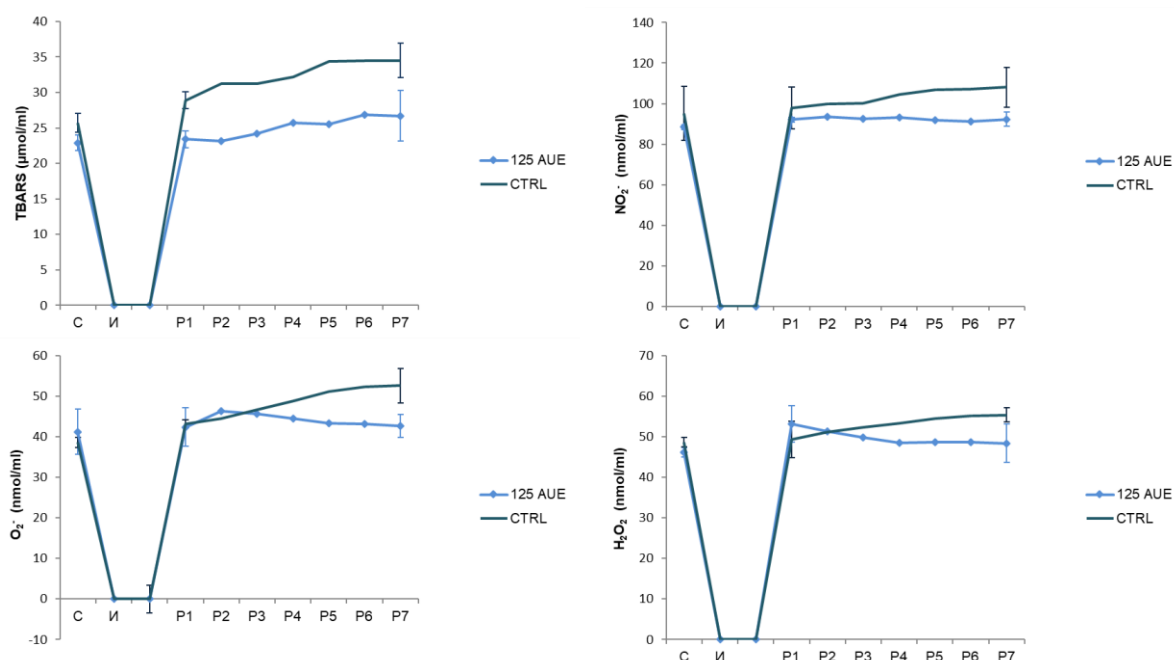


График 15. Вредности прооксидационих параметара (TBARS, NO_2^- , O_2^- и H_2O_2) код пацова на третману екстрактном сремуша у дози од 125 mg/kg. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

4.7.3. Вредности маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента здравих пацова на третману екстрактом сремуса у дози од 250 mg/kg

Вредности маркера оксидационог стреса приказане су табеларно и графички (Табела 26, График 16). Приказане су вредности прооксиданаса у тачкама од интереса код пацова на третману екстрактом сремуса у дози од 250 mg/kg, као и разлика у вредностима параметара између третираних и нетретираних здравих пацова.

Вредности посматраних прооксидационих параметара нису се значајно мењале током С, P1 и P7 у групи на третману екстрактом сремуса у дози од 250 mg/kg. Када се упореде вредности између група на третману екстрактом и контролне групе уочава се снижење TBARS, NO₂⁻ и O₂⁻ на крају реперфузије у третираној групи.

Табела 26. Вредности маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента код пацова на третману екстрактом сремуса у дози од 250 mg/kg

		TBARS (μmol/ml)	NO ₂ ⁻ (nmol/ml)	O ₂ ⁻ (nmol/ml)	H ₂ O ₂ (nmol/ml)
CTRL	C	25,7 ± 1,3	95,2 ± 13,4	38,6 ± 1,2	48,7 ± 1,2
	P1	28,9 ± 1,2	97,8 ± 10,2	43,1 ± 1,2	49,3 ± 4,5
	P7	34,5 ± 2,4	108,1 ± 9,8	52,6 ± 4,4	55,4 ± 1,88
250 AUE	C	23,7 ± 1,4	86,9 ± 3,5*	43,3 ± 2,6	51,2 ± 4,2
	P1	26,3 ± 2,7	91,3 ± 2,2	45,6 ± 3,8	53,4 ± 6,6
	P7	24,9 ± 1,9*	83,9 ± 3,9*	42,8 ± 2,7*	50,9 ± 3,9

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X±SD). С - стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - тридесети минут реперфузије; ^aСтатистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку С унутар групе; ^bСтатистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у односу на тачку P1 унутар групе.*Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 између групе CTRL и 250 AUE у тачки од интереса.

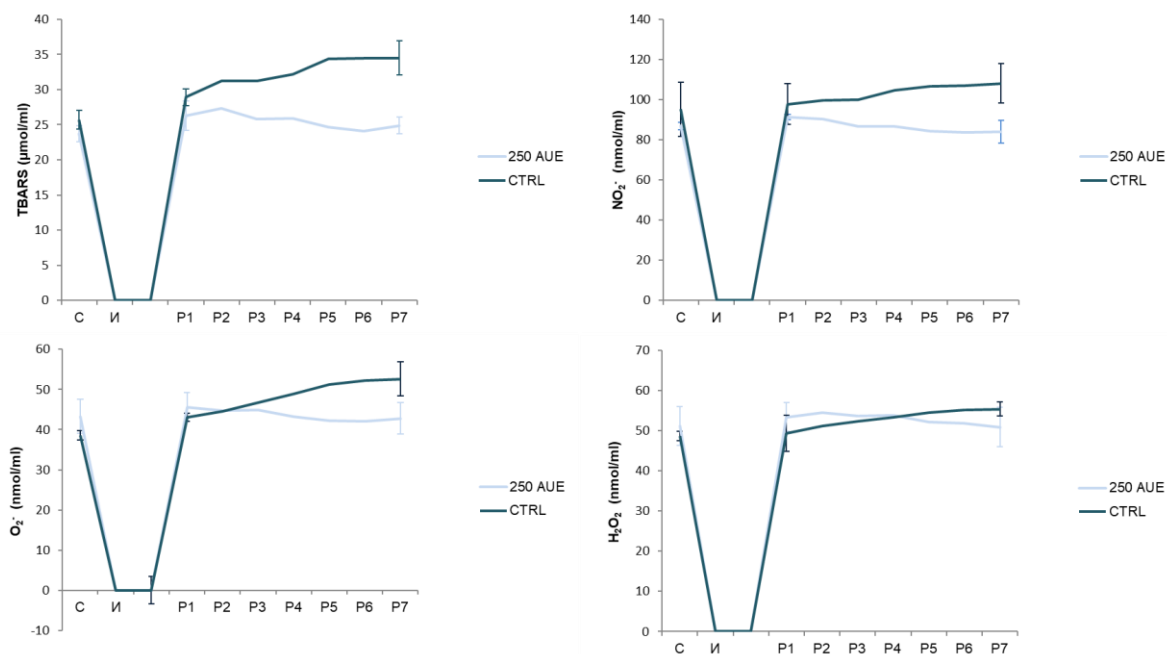


График 16. Вредности прооксидационих параметара (TBARS, NO₂⁻, O₂⁻ и H₂O₂) код пацова на третману екстрактном сремуша у дози од 250 mg/kg. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X±SD).

4.7.4. Вредности маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента здравих пацова на третману екстрактном сремуша у дози од 500 mg/kg

Вредности маркера оксидационог стреса приказане су табеларно и графички (Табела 27, График 17). Приказане су вредности прооксиданаса у тачкама од интереса код пацова на третману екстрактном сремуша у дози од 500 mg/kg, као и разлика у вредностима параметара између третираних и нетретираних здравих пацова.

Вредности прооксидационих маркера се нису значајно мењале током посматраних тренутака времена у групи која је конзумирала екстракт сремуша у дози од 500 mg/kg. Поређењем вредности између група на третману екстрактном сремуша у дози од 500 mg/kg и контролне групе уочава се снижење TBARS, NO₂⁻ и O₂⁻ на крају реперфузије у третираној групи.

Табела 27. Вредности маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента код пацова на третману екстрактном сремуша у дози од 500 mg/kg

		TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	NO_2^- (nmol/ml)	O_2^- (nmol/ml)	H_2O_2 (nmol/ml)
CTRL	C	25,7 \pm 1,3	95,2 \pm 13,4	38,6 \pm 1,2	48,7 \pm 1,2
	P1	28,9 \pm 1,2	97,8 \pm 10,2	43,1 \pm 1,2	49,3 \pm 4,5
	P7	34,5 \pm 2,4	108,1 \pm 9,8	52,6 \pm 4,4	55,4 \pm 1,88
500 AUE	C	21,2 \pm 1,7	85,3 \pm 5,4	42,5 \pm 5,9	50,8 \pm 1,5
	P1	23,4 \pm 2,6	91,2 \pm 3,9	45,6 \pm 2,9	52,3 \pm 6,7
	P7	22,9 \pm 2,9*	86,9 \pm 6,7*	41,9 \pm 3,2*	49,9 \pm 2,3

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). C - стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - тридесети минут реперфузије; ^aСтатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку C унутар групе; ^bСтатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку P1 унутар групе. *Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе CTRL и 500 AUE у тачки од интереса.

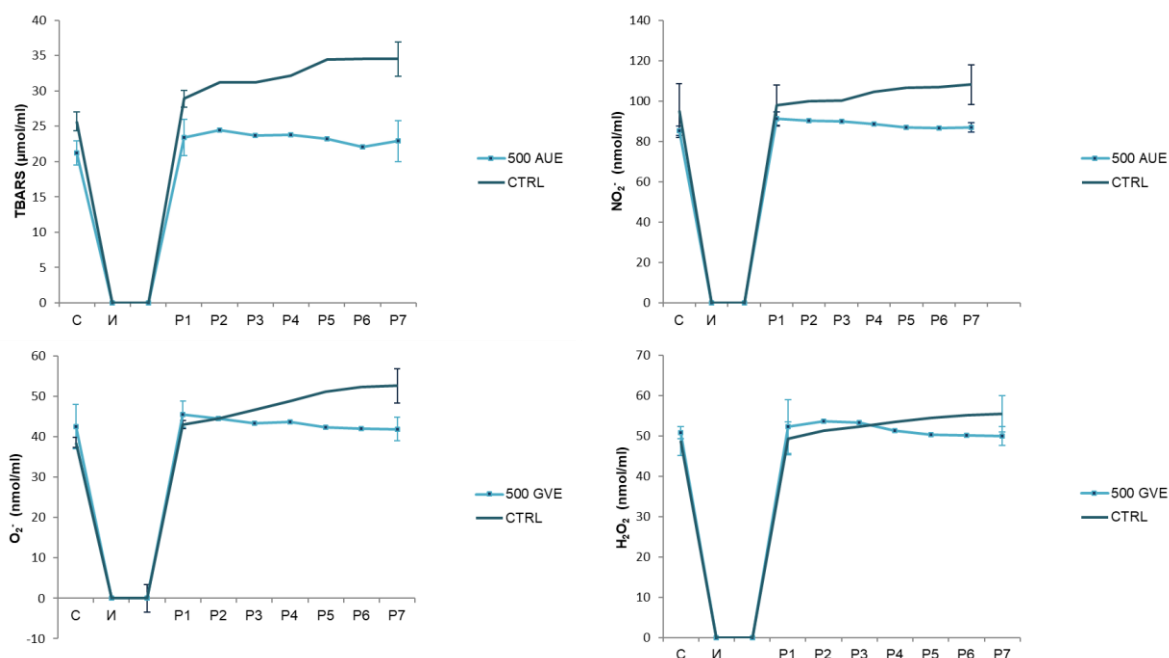


График 17. Вредности прооксидационих параметара (TBARS, NO_2^- , O_2^- и H_2O_2) код пацова на третману екстрактном сремуша у дози од 500 mg/kg. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

4.7.5. Поређење ефеката растућих доза екстракта сремуша на маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента здравих пацова

Разлике у ефектима растућих доза екстракта сремуша на прооксидансе код здравих животиња приказане су приказане су табеларно и графички (Табела 28, График 18).

Статистички значајно више вредности TBARS уочене су након примене средње дозе у односу на преостале две дозе у првом минуту реперфузије. На крају реперфузије значајно нижи ниво овог параметра уочене је након примене највише у односу на најнижу дозу. Вредности NO_2^- , O_2^- и H_2O_2 нису се значајно разликовале између група на третману екстрактом сремуша у растућим дозама.

Табела 28. Разлике у ефектима конзумације растућих доза екстраката сремуша на маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента код здравих пацова

		TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	NO_2^- (nmol/ml)	O_2^- (nmol/ml)	H_2O_2 (nmol/ml)
125 vs 250	C	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
	P1	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
	P7	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
250 vs 500	C	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
	P1	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
	P7	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
125 vs 500	C	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
	P1	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
	P7	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

p<0,05 указује на статистички значајну разлику када се пореде вредности здравих пацова на третману растућим дозама екстракта.

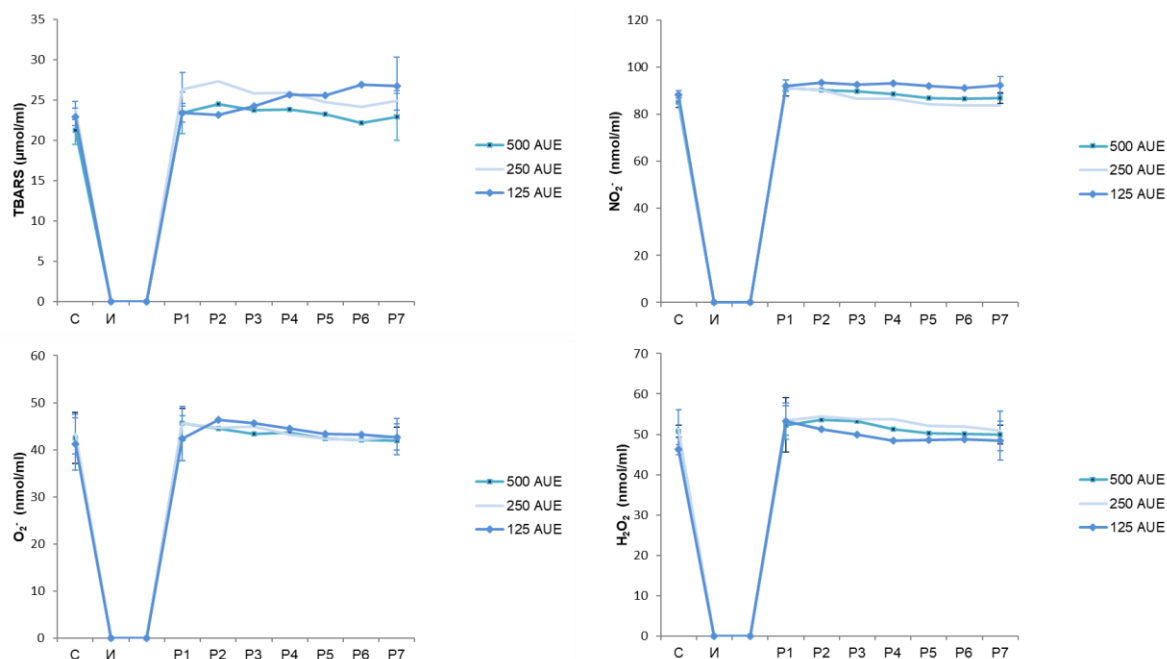


График 1. Ефекти конзумације растућих доза екстраката сремуша на вредности прооксидационих параметара (TBARS, NO₂⁻, O₂⁻ и H₂O₂) код здравих пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X±SD).

4.7.6. Вредности маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента спонтано хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 125 mg/kg

Вредности маркера оксидационог стреса приказане су табеларно и графички (Табела 29, График 19). Приказане су вредности прооксиданаса у тачкама од интереса код хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 125 mg/kg, као и разлика у вредностима параметара између третираних и нетретираних спонтано хипертензивних пацова.

Вредности посматраних прооксидационих параметара нису се значајно мењале током С, Р1 и Р7 у групи спонтано хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 125 mg/kg. Када се упореде вредности између група на третману екстрактом и нетретиране хипертензивне групе уочава се снижење TBARS на крају реперфузије у групи која је конзумирала екстракт сремуша. Остали параметри бележили су сличне вредности у обе групе.

Табела 29. Вредности маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента код хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 125 mg/kg

		TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	NO_2^- (nmol/ml)	O_2^- (nmol/ml)	H_2O_2 (nmol/ml)
SHR	C	29,3 \pm 1,8	92,7 \pm 13,2	41,2 \pm 1,2	53,4 \pm 3,6
	P1	34,5 \pm 2,1	100,1 \pm 12,18	43,4 \pm 3,6	56,7 \pm 4,1
	P7	36,7 \pm 2,38	97,1 \pm 12,7	51,9 \pm 2,58	63,8 \pm 4,58
H125AUE	C	30,2 \pm 1,2	96,7 \pm 2,5	45,7 \pm 1,7	56,7 \pm 2,6
	P1	31,3 \pm 3,7	99,2 \pm 4,9	48,9 \pm 3,5	62,3 \pm 4,5
	P7	30,6 \pm 1,4*	100,4 \pm 8,9	46,2 \pm 3,4	60,2 \pm 3,8

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). C - стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - тридесети минут реперфузије; ^aСтатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку C унутар групе; ^bСтатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку P1 унутар групе. *Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе SHR и H125 AUE у тачки од интереса.

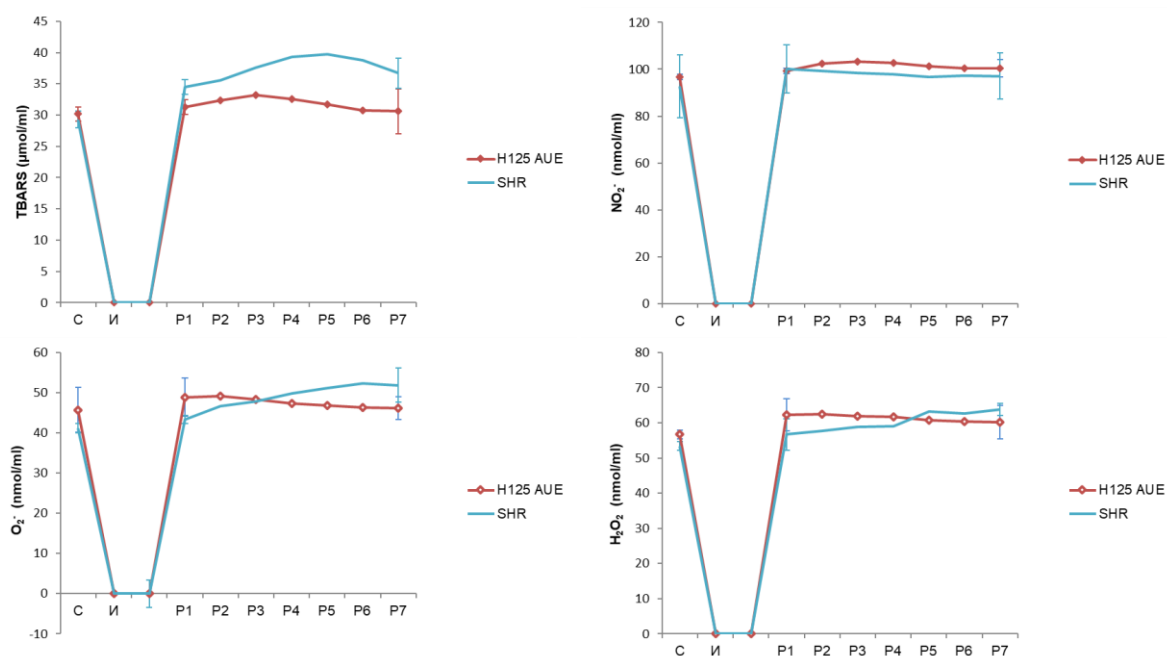


График 19. Вредности прооксидационих параметара (TBARS, NO_2^- , O_2^- и H_2O_2) код хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 125 mg/kg. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

4.7.7. Вредности маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента спонтано хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 250 mg/kg

Вредности маркера оксидационог стреса приказане су табеларно и графички (Табела 30, График 20). Приказане су вредности прооксиданаса у тачкама од интереса код хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 250 mg/kg, као и разлика у вредностима параметара између третираних и нетретираних спонтано хипертензивних пацова.

Вредности прооксиданаса биле су сличне током експерименталног протокола у групи спонтано хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 250 mg/kg. Поређењем вредности између група на третману екстрактом и нетретиране хипертензивне групе уочава се пад нивоа TBARS и NO_2^- на почетку и крају реперфузије у групи која је током 4 недеље употребљавала екстракт сремуша. С друге стране, концентрација O_2^- и H_2O_2 била је значајно виша у стабилизацији и на почетку реперфузије у групи на третману екстрактом.

Табела 30. Вредности маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента код хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 250 mg/kg

		TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	NO_2^- (nmol/ml)	O_2^- (nmol/ml)	H_2O_2 (nmol/ml)
SHR	C	29,3 ± 1,8	92,7 ± 13,2	41,2 ± 1,2	53,4 ± 3,6
	P1	34,5 ± 2,1	100,1 ± 12,18	43,4 ± 3,6	56,7 ± 4,1
	P7	36,7 ± 2,38	97,1 ± 12,7	51,9 ± 2,58	63,8 ± 4,58
H250AUE	C	26,7 ± 1,7	88,6 ± 2,3	48,75 ± 1,5	60,2 ± 1,7*
	P1	28,9 ± 0,9*	92,1 ± 7,8*	52,4 ± 4,6*	61,2 ± 5,6*
	P7	27,2 ± 0,2*	86,1 ± 3,9*	49,8 ± 3,9	63,1 ± 2,8

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). С - стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - тридесети минут реперфузије; ^aСтатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку С унутар групе; ^bСтатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку P1 унутар групе. *Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе SHR и H250 AUE у тачки од интереса.

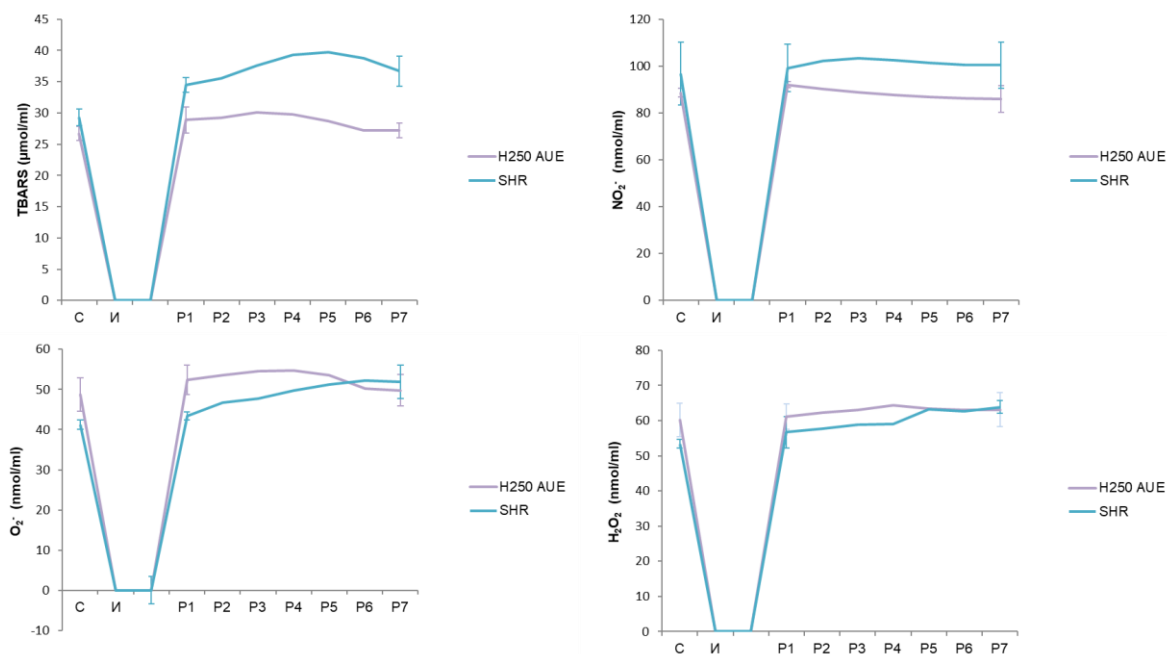


График 20. Вредности прооксидационих параметара (TBARS, NO₂⁻, O₂⁻ и H₂O₂) код хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 250 mg/kg. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X±SD).

4.7.8. Вредности маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента спонтано хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 500 mg/kg

Вредности маркера оксидационог стреса приказане су табеларно и графички (Табела 31, График 21). Приказане су вредности прооксиданаса у тачкама од интереса код хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 500 mg/kg, као и разлика у вредностима параметара између третираних и нетретираних спонтано хипертензивних пацова.

Вредности прооксиданаса нису значајно варирали током експерименталног протокола у групи спонтано хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 500 mg/kg. Поређењем вредности између група на третману екстрактом и нетретиране хипертензивне групе уочава се пад нивоа TBARS у свим посматраним тренуцима у групи која је орално уносила екстракт сремуша током 4 недеље. Додатно, концентрација H₂O₂ била је значајно виша на крају реперфузије у групи на третману екстрактом у односу на нетретиране пацове.

Табела 31. Вредности маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента код хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 500 mg/kg

		TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	NO_2^- (nmol/ml)	O_2^- (nmol/ml)	H_2O_2 (nmol/ml)
SHR	C	29,3 \pm 1,8	92,7 \pm 13,2	41,2 \pm 1,2	53,4 \pm 3,6
	P1	34,5 \pm 2,1	100,1 \pm 12,18	43,4 \pm 3,6	56,7 \pm 4,1
	P7	36,7 \pm 2,38	97,1 \pm 12,7	51,9 \pm 2,58	63,8 \pm 4,58
H500AUE	C	25,6 \pm 0,98*	90,4 \pm 1,2	46,8 \pm 4,5	54,5 \pm 1,8
	P1	26,8 \pm 1,12*	96,7 \pm 5,6	49,8 \pm 3,6	56,7 \pm 7,9
	P7	26,9 \pm 1,8*	94,1 \pm 3,8	45,6 \pm 4,7	55,7 \pm 6,7*

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$). C - стабилизација; P1 - први минут реперфузије; P7 - тридесети минут реперфузије; ^aСтатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку C унутар групе; ^bСтатистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на тачку P1 унутар групе. *Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ између групе SHR и H500 AUE у тачки од интереса.

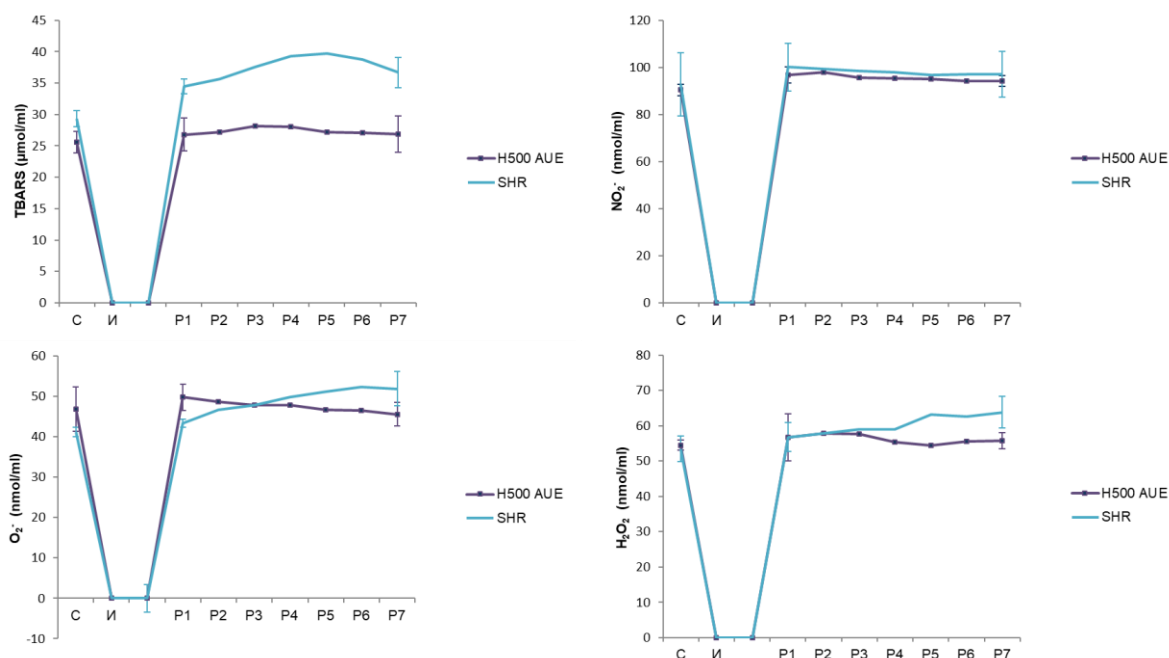


График 21. Вредности прооксидационих параметара (TBARS, NO_2^- , O_2^- и H_2O_2) код хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуша у дози од 500 mg/kg. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$).

4.7.9. Поређење ефеката растућих доза екстракта сремуша на маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента спонтано хипертензивних пацова

Разлике у ефектима растућих доза екстракта сремуша на прооксидансе код спонтано хипертензивних животиња приказане су приказане су табеларно и графички (Табела 32, График 22).

Статистички значајно ниже вредности TBARS уочене су након примене највише и средње дозе у односу на најнижу дозу у првом и последњем минуту реперфузије. Такође вредност овог параметра била је нижа у групи на третману највишом у односу на средњу дозу у првом минуту и у односу на најнижу дозу у стабилизацији. На крају реперфузије значајно нижи ниво NO_2^- уочен је код пацова који су конзумирали екстракт сремуша у дози од 250 у односу на 125 mg/kg. Значајно виша вредност O_2^- детектована је код пацова на третману средњом у односу на преостале две дозе у првом и последњем моменту реперфузије. У првом и последњем минуту вредности H_2O_2 биле су ниже код пацова на третману највишом у односу на преостале дозе.

Табела 32. Разлике у ефектима конзумације растућих доза екстракта сремуша на маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента код хипертензивних пацова

		TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	NO_2^- (nmol/ml)	O_2^- (nmol/ml)	H_2O_2 (nmol/ml)
125 vs 250	C	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
	P1	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05
	P7	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p>0,05
250 vs 500	C	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
	P1	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05
	P7	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05
125 vs 500	C	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
	P1	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05
	P7	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05

p<0,05 указује на статистички значајну разлику када се пореде вредности хипертензивних пацова на третману растућим дозама екстракта.

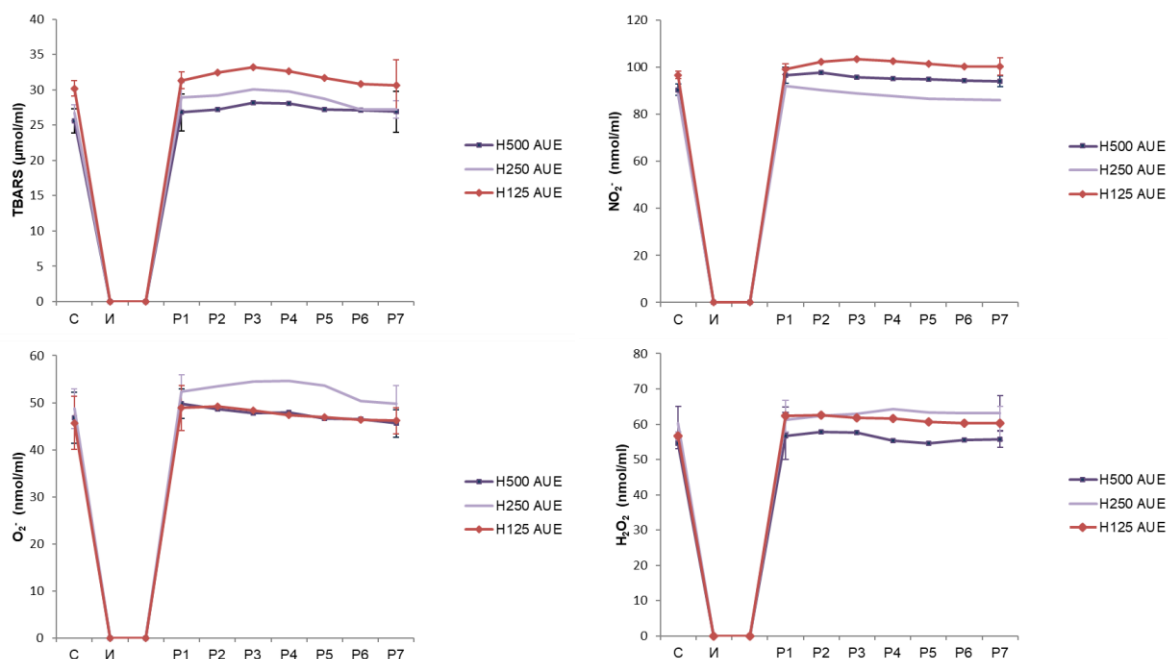
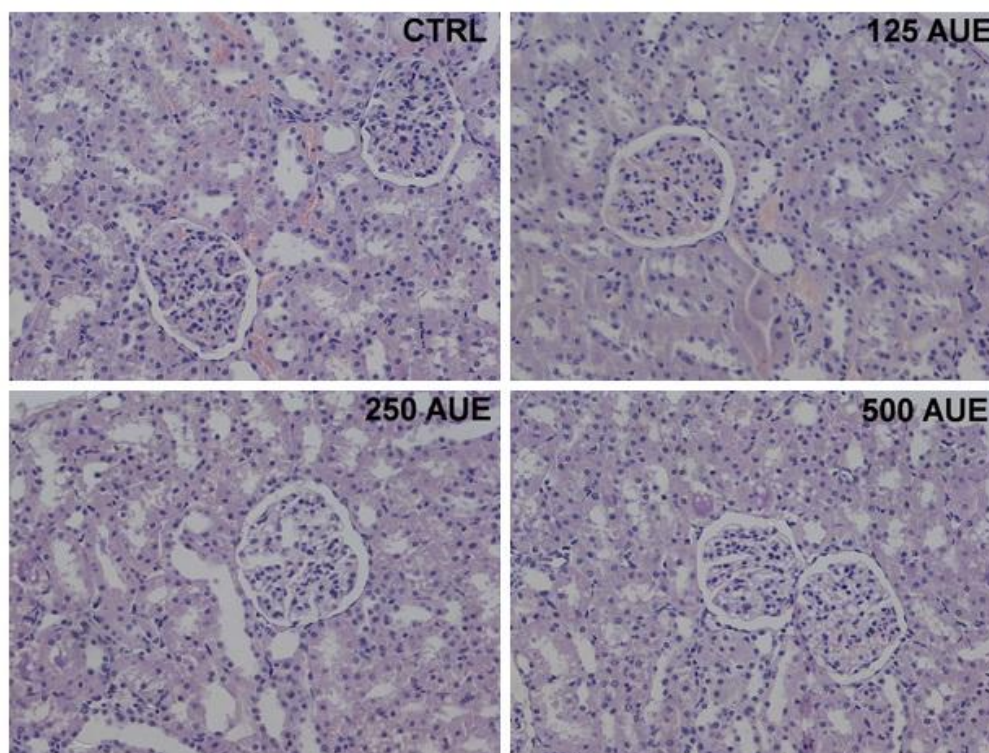


График 22. Ефекти конзумације растућих доза екстракта сремуша на вредности прооксидационих параметара (TBARS, NO₂⁻, O₂⁻ и H₂O₂) код здравих пацова. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (X±SD).

4.8. Ефекти екстракта сремуша на морфологију органа пацова

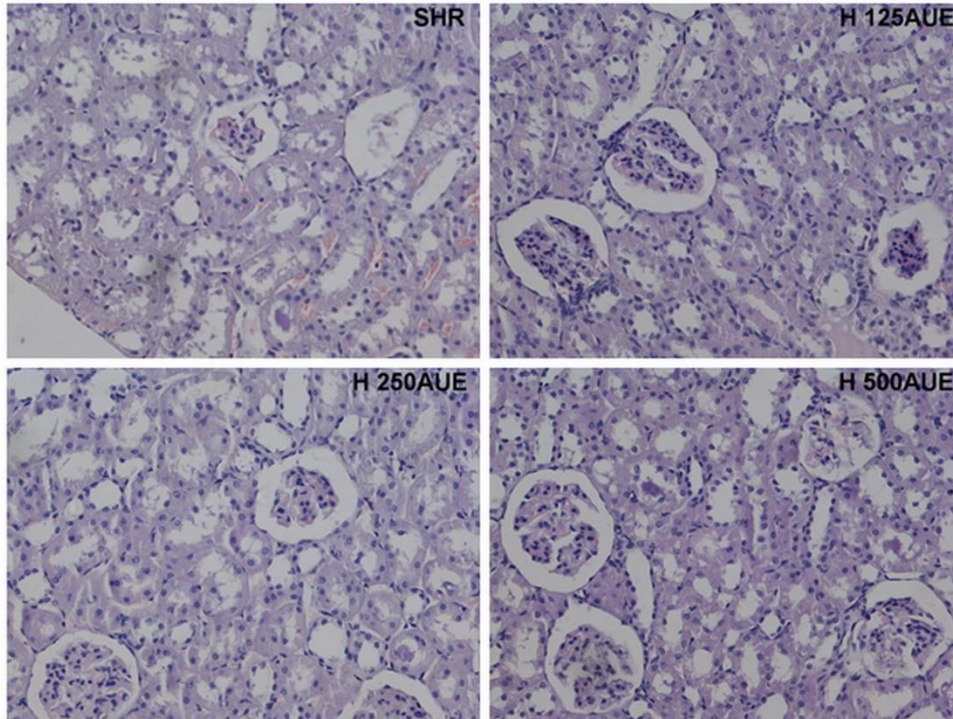
4.8.1. Ефекти екстракта сремуша на морфологију бубрега пацова

У контролној групи нормотензивних пацова не уочавају се морфолошке промене у грађи бубрега, нефрони су очуване грађе, ренални корпускули са гломерулима нормалних димензија без проширења уринарног простора, епител проксималних и дисталних тубула без видљивих промена, без присуства десквамације. У групама пацова који су били на третману екстрактом сремуша у дозама од 125 mg, 250 mg и 500 mg гломерули су очуване грађе, епител тубула без промена, без присуства десквамације (Слика 3).



Слика 3. Ткивни пресеци бубрега нормотензивних пацова. Увеличање 20 x бар=50µm.

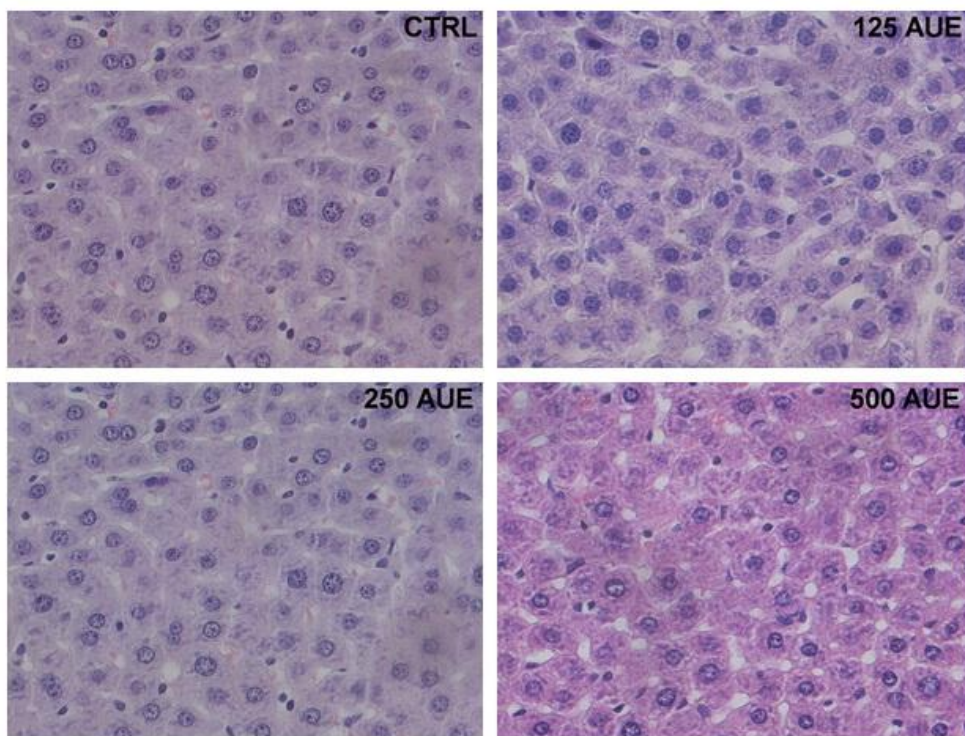
У контролној групи спонтано хипертензивних пацова уочава се атрофија гломерура, проширен уринарни простор. Тубули нефрона очуване грађе, док се у сабирним тубулима уочава фокална десквамација епитела са појединачним пикнотичним једрима. У групи животиња које су биле на третману екстрактом у дози од 125 mg већина гломерула је атрофична са присуством појединачних гломерула очуване грађе, епител тубала делимично измењен са присуством десквамације. У групи пацова који су били на третману екстрактом у дози од 250 mg, већина гломерула је очувана али су присутни и појединачна атрофисани гломерули, фокално су присутна проширења дисталних тубула, тубули су очуване грађе без десквамације. Сремуш у дози од 500 mg значајно је побољшао морфолошку структуру бубрега. Уочава се очуваност гломерула, присутне су благе промене епитела проксималних тубула док је епител сабирних тубула благо измењен (Слика 4).



Слика 4. Ткивни пресеци бубрега спонтано хипертензивних пацова. Увеличање 20 х бар=50µm.

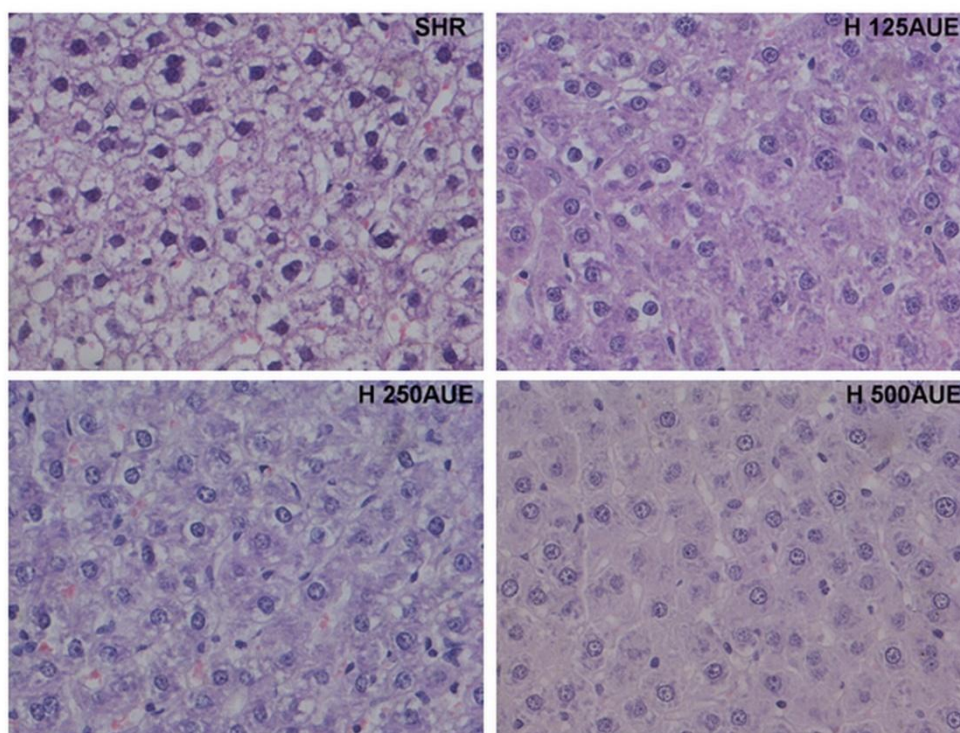
4.8.2. Ефекти екстракта сремуша на морфологију јетре пацова

На сликама хистолошких пресека јетре, у контролној групи нормотензивних пацова не уочавају се морфолошке промене, хепатоцити су регуларне грађе са присутним садржајем гликогена и еухроматичним једрима. У групама животиња које су биле на третману сремушом у дози 125 mg, 250 mg и 500 mg не уочавају се промене у ткивној архитектури, нема инфламације нити инфилтрације. Хепатоцити очуване грађе и еухроматичних једара без присуства едема и вакуолизације (Слика 5).



Слика 5. Ткивни пресеци јетре нормотензивних пацова. Увеличање 40 x бар=20 μ m.

У контролној групи спонтано хипертензивних пацова (SHR) уочава се едем и дифузна вакуолизација хепатоцита (балонирани хепатоцити). У групи животиња који су били на третману екстрактом сремуша у дози од 125 mg уочава се едем и вакуолизација цитоплазме хепатоцита али блаже изражен у односу на SHR групу и доминатно захвата централобуларне ћелије. У групи животиња који су добијали дозу сремуша од 250 mg уочавају се почетни знаци едема и вакуолизације хепатоцита, промене су слабије изражене у односу на групу спонтано хипертензивних пацова и групу која је била на третману сремуша у дози од 125 mg. У групи животиња који су били на третману екстрактом у дози од 500 mg уочава се нормална морфолошка грађа ткива, хепатоцити су без видљивих промена, без присуства едема и вакуолизације (у хепатоцитима је присутан гликоген) (Слика 6).



Слика 6. Ткивни пресеци јетре спонтано хипертензивних пацова. Увеличање 40 x бар=20 μ m.

4.8.3. Ефекти екстракта сремуса на морфологију срца пацова након И-Р повреде

У контролној групи нормотензивних пацова уочава се хипертрофија појединачних мишићних влакана са присутним дегенеративним променама, хиперцелуларности строме (ћелијски инфилтрат), едемом интерстицијума и пикнозом једра. У групи животиња која су била на третману сремуса у дози од 125mg уочава се хипертрофија појединачних мишићних влакана, дегенеративне промене, хиперцелуларност строме који су за нијансу мање уочљиви у односу на контролну групу. У групи која је третирана сремусом у дози од 250mg присутне су дегенеративне промене, хиперцелуларност строме и едем интерстицијума који је мање приметан у односу на контролну групу и АУЕ 125 mg. Степен дегенеративних промена као и присуство ћелијског инфилтрата и едема интерстицијума најмање је у очљив у групи која је добија сремус у дози од 500mg, али су присутна благо измењена једра (Табела 33 и 34, Слика 7).

У контролној групи спонтано хипертензивних пацова уочавају се хипертрофисана мишићна влакана са присуством дегенеративних промена, таласаста влакна, хиперцелуларна строма (ћелијски инфилтрат) са губитком једра и едемом интерстицијума. У Н125 АУЕ групи уочава се хипертрофија мишићних влакана, таласаста влакна са присуством дегенеративних промена, хиперцелуларном стромом са пикнозом једара и едем интерстицијума који су мање изражени у односу на SHR групу. Доза сремуса од 250mg у групи спонтано хипертензивних пацова смањила је присуство дегенеративних промена, хиперцелуларност строме, едем интестицијума у

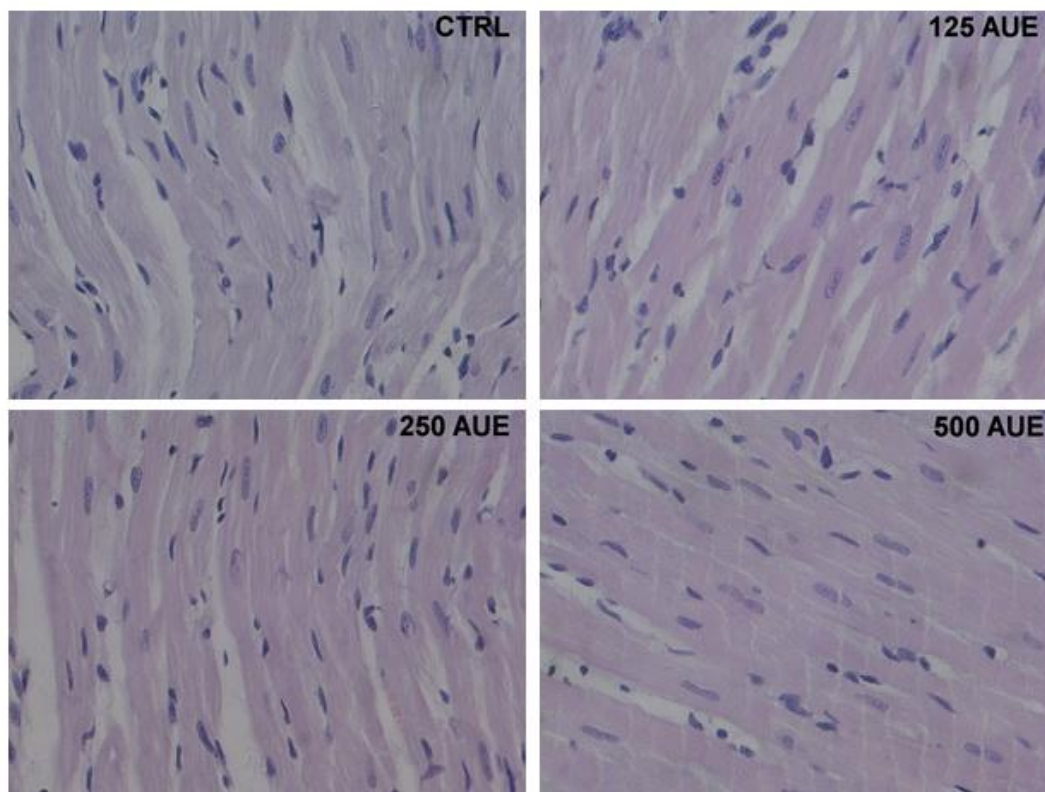
односу на SHR и H125 AUE групе али се и даље уочавају промене на једру у смислу појаве затупастих једара. Највећи степен смањења дегенеративних промена, хиперцелуларности строме (фокално присутан) као и едема интерстицијума са почетним променама једра уочен је у групи која је добијала највећу дозу сремуса (500 mg) (Табела 33 и 34, Слика 8).

Табела 33. Хистолошке промене које се односе на степен присуства или одсуство таласастих влакана и хипертрофије мишићних влакана.

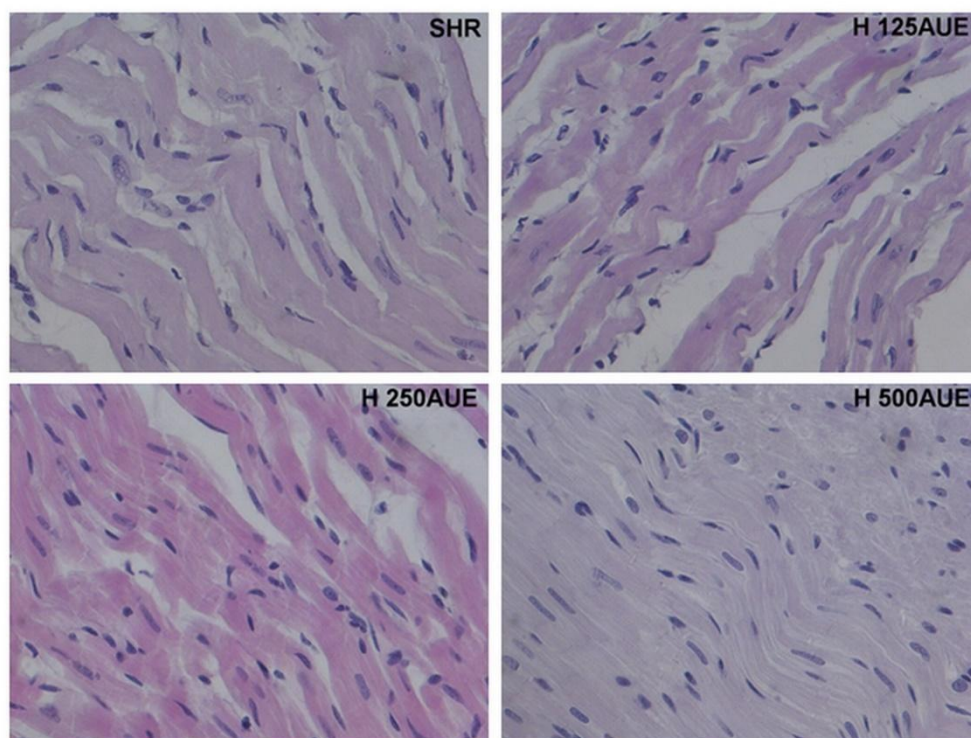
Групе	Таласаста мишићна влакна	Хипертрофија мишићних влакана
CTRL	++	+
125 AUE	-	+
250 AUE	-	-
500 AUE	-	-
SHR	+++	+++
H 125 AUE	++	++
H 250 AUE	++	+
H 500 AUE	+	+

Табела 34. Хистолошке промене које се односе на степен присуства или одсуство дегенеративних промена, проширеног интерстицијума као и хиперцелуларне строме кардиомиоцита.

Групе	Дегенеративне промене	Проширен интерстицијум	Хиперцелуларна строма
CTRL	+++	+	+++
125 AUE	++	+	++
250 AUE	++	-	++
500 AUE	+	-	+
SHR	+++	+++	+++
H 125 AUE	++	++	++
H 250 AUE	++	+	++
H 500 AUE	+	+	+



Слика 7. Ткивни пресеци срца нормотензивних пацова. Увеличање 40 х бар=20 μ m.



Слика 8. Ткивни пресеци срца спонтано хипертензивних пацова. Увеличање 40 х бар=20 μ m.

5. Дискусија

5.1. Утицај примењених растварача на хемијски састав екстраката сремуша и способност неурализације DPPH радикала

Литературни подаци потврђују да се поларност примењеног растварача одражава на концентрацију једињења што указује на значај проналаска оптималног растварача за испољавање жељене терапијске активности екстракта (102). Досадашња испитивања сремуша нису открила разлику у хемијском саставу као и укупном садржају фенола и флавоноида у воденом, метанолном и хлороформском екстракту сремуша. У нашој студији откривено је да су најзаступљенија једињења у воденом и метанолном екстракту кемпферол 3-O-Glc, р-кумаринска киселина, ферулинска киселина, кемпферол, с тим што је њихова концентрација виша у воденом екстракту. У хлороформском екстракту поред наведених једињења издваја се још и урсолна киселина. Додатно, највиша концентрација ферулинске киселине и кемпферола била је присутна у хлороформском екстракту. Претходно спроведена истраживања која су се односила на испитивања хемијског састава и лековитих својстава сремуша углавном су била оријентисана на екстракцију ове биљне врсте на собној температури. Насупрот томе, у овом истраживању примењивали смо екстракцију под рефлуксом, односно екстракцију на тачки кључања растварача. Будући да складиштење сремуша током времена у одређеној мери утиче на губитак испарљивих биоактивних молекула који садрже сумпор, али у мањем степену и фенолних једињења, налази нашег истраживања одражавају потенцијал употребе сремуша током целе године, не само у периоду цветања. Због тога смо имали за циљ да испитамо укупну концентрацију фенола и флавоноида у воденим, метанолним и хлороформским екстрактима добијеним из листова сремуша на овај начин. Резултати студије указују на то да је највиши садржај фенола и флавоноида забележен у хлороформском екстракту. Аутори претходних студија су показали да метанолни екстракти имају већи садржај укупних фенола у поређењу са воденим (64), међутим, у нашој студији није било разлике између садржаја фенола у ове две врсте екстраката. Такође, потврђено је и да место прикупљања биљног материјала утиче на хемијски састав екстраката сремуша (103). Када се упореде доступне методе за екстраховање биљног материјала, метода под рефлуксом се истиче у односу на ултразвучну екстракцију која се примењивала у претходној студији, јер се током излагања ултразвуку може догодити разградња неких биоактивних једињења (104). Наши резултати снажно потврђују да растварач који се користи у припреми екстракта утиче на садржај фенола. Количина фенолних једињења у екстрактима у великој мери поред растварача зависи од поларности и услова екстракције (105). Додатно, важан фактор који утиче на концентрацију активних компоненти је време бербе (106). Важно је истакнути да поларност растварача који се користи за екстракцију пре свега утиче не само на количину фенола већ и на количину флавоноида и других полифенола. Растворљивост биомолекула зависи од поларности растварача, што може објаснити наше резултате. Фактори који највише утичу на растворљивост полифенола су молекулска маса, позиција ОН група и дужина угљоводоничних ланаца (107).

Помоћу DPPH теста процењивали смо капацитет екстраката различите поларности да неутралишу DPPH радикал. Ова метода се у литератури издваја као корисна за праћење антиоксидационе активности различитих екстраката (108). Уочили смо да је највећа активност присутна у случају метанолног екстракта, па затим воденог. На висок антиоксидативни потенцијал наших екстраката делимично је утицала екстракција на повишеној температури, јер се наводи да повећање температуре екстракције доводи до смањења IC50 (109). Претходне студије су показале да алкохолни екстракти поседују већу активност у поређењу са воденим (110). Додатно,

утврђено је да водени екстракт има већи потенцијал да неутралише DPPH радикал од 70% етанола. Овај резултат може се објаснити присуством веће концентрације поларних фенолних једињења са јачим антиоксидативним деловањем (109). Студија која је пратила утицај растварача на антиоксидациону активност открила је да је коришћење 80% метанола ефикасније у поређењу са етанолом. На основу доступних информација можемо претпоставити да присуство флавоноида углавном доприноси антиоксидативном потенцијалу екстракта сремуша. Иако је претходно предложена корелација између антиоксидативне активности и садржаја фенола у екстракту, ова два параметра нису нужно у корелацији. Наши резултати указују на највећи садржај фенола у хлороформском и највећу антиоксидациону моћ метанолног екстракта.

5.2. Утицај примењених растварача на антимикуробно деловање сремуша

Један од изузетно важних глобалних проблема у здравству представља појава бактеријске резистенције. Све је већа потреба за новим антибиотицима услед високе смртности пацијената од инфекција које не реагују на тренутно доступну терапију (111). У 2013. години пријављено је 9,2 милиона смртних случајева због инфекција па је научна јавност окренута ка развоју разних стратегија за превазилажење резистенције на антибиотике. Користан приступ базирао би се на примени агенаса са антимикуробним деловањем који нису антибиотског порекла попут фитопрепарата (112). Утицај сремуша на микроорганизме је забележен, међутим ово поље није у потпуности истражено и недостају подаци о томе који би процес екстракције и растварач требало користити како би добијени екстракт испољио најинтензивније антимикуробно деловање. У том смислу, имајући у виду да примењени растварач утиче на фармаколошко деловање екстракта, један од циљева ове студије био је да испита антимикуробно деловање воденог, метанолног и хлороформског екстракта сремуша.

Показали смо да интензитет антимикуробне активности зависи од типа микроорганизма и растварача. Највећу активност показао је хлороформски екстракт, и према Грам-позитивним бактеријама и према гљивама.. Наши резултати су делимично у корелацији са осталим студијама које указују на генерално слабу активност екстракта сремуша, при чему се истиче већа активност ка *S. aureus* и *A. niger* (113). Такође је показано да етанолни и водено метанолни екстракти сремуша могу испољити изражено деловање према *S. enteritidis*, *E. coli*, *P. mirabilis* и *E. Faecalis* (114). За разлику од нашег истраживања, аутори претходне публикације указују на то да екстракт сремуша може да инхибира раст *Candida* spp. ћелије у концентрацијама у распону од 0,5 до 4,0 mg/ml (115). Неусаглашеност у нашим резултатима са резултатима претходно описаног истраживања може бити последица примене различите методе екстракције и сходно томе различитог хемијског састава. Генерално посматрано, у нашем истраживању најбоља антимикуробна активност свих екстраката била је према соју *B. subtilis* ATCC 6633, са вредностима МИК 0,313-2,5 mg/ml.

У свежем облику сремуш може испољити снажан ефекат јер се смара да алицин може блокирати сулфхидрил зависне ензиме и синтезу ДНК и протеина (112). У нашој студији обзиром на примењену методу екстракције, антимикуробни потенцијал се може приписати највероватније садржају полифенола. Међу најзаступљенијим једињењима у екстрактима били су р- кумаринска киселина, ферулинска киселине и кемпферол и његови деривати. Литературни подаци сведоче о антимикуробном потенцијалу р-

кумаринске киселине па она сигурно у одређеном проценту доприноси уоченом ефекту у нашој студији (116).

Аутори раније спроведеног експеримента показали су да ферулинска киселина поседује антимикробне ефекте при чему су забележене вредности МИК/МБЦ од 100/2500 µg/ml за *E.coli*, 100/500 µg/ml за *P. aeruginosa* и 1100/5000µg/ml за *S. aureus*. Механизам путем ког ово једињење остварује свој ефекат базира се на трајним променама у мембрани микроорганизама што у крајњем доводи до спречавања развоја инфекције (117). Додатно је потврђено да ферулинска киселина може деловати и на сој *Cronobacter sakazakii* (118). Поред р- кумаринске и ферулинске киселине, такође је показано и да деривати кемпферола спречавају раст микроорганизама (119). Предложени механизам одговоран за деловање кемпферола је инхибиција ефлукс пумпе која избацује антибиотик и тиме спречавања његов терапијски учинак. Тај податак отвара могућност ка примени екстракта сремуша као адитивне терапије уз постојећи антибиотик чиме би се ефекти антибиотика у многоне повећали.

Када се упореди хемијски састав са уоченим антимикробним ефектима јасно се уочава да је у нашој студији екстракт са највећом концентрацијом претходно описаних полифенола испољио најинтензивније деловање. С друге стране, антимикробна активност воденог и метанолног екстракта није се значајно разликовала у нашој студији, док претходна студија указује на значајно већи антимикробни потенцијал метанолног екстракта (120). Међутим, дискрепанца у резултатима може бити последица примене различите методе за екстраховање биљног материјала и последично другачијег хемијског профила.

Наша студија указује на могућност примене хлороформског екстракта сремуша самостално или у комбинацији са антибиотцима против широког спектра бактерија.

5.3. Утицај екстракта сремуша на инфламацију шапе пацова

Велико оптерећење за здравствени систем представљају хроничне болести попут кардиоваскуларних, малигних, аутоимунских где се као један од кључних патолошких догађаја издваја инфламација (121). Утврђена је повезаност бројних медијатора запаљења са кардиоваскуларним ризиком што указује на то да би терапијска стратегија за ублажавање инфламације значајно унапредила здравље људи и спречила компликације (122). Како тренутно доступни антиинфламаторни лекови, нарочито кортикостероиди, носе ризик од развоја озбиљних нежељених ефеката, све већа пажња научника усмерева се ка развоју нових безбеднијих терапијских модалитета. Логичан приступ базира се на испитивању биљних врста из рода *Allium* попут белог лука и сремуша које се више хиљада година издвајају као вредне намирнице за спречавање хроничних болести.

У нашој студији користили смо модел карагенином изазване акутне инфламације шапе пацова који се издваја као погодан тест за прикупљање прелиминарних информација о антиинфламаторном деловању екстракта или биоактивних једињења. Резултати су показали да су све три дозе екстракта довеле до инхибиције едема у поређењу са нетретираном контролом при чему је степен инхибиције варирао у зависности од тренутка времена. Најизраженији ефекат испољила је доза од 200 mg/kg након 4. сата када је проценат инхибиције био највећи и то 48,21%. Ниједна од примењених доза није показала потенцијал сличан стандардном леку индометацину који је несумњиво довео до највећег смањења едема шапе свим посматраним тренуцима времена. На основу литературних података очекује се да након апликације карагенина у првом периоду долази до ослобађања хистамина и серотина.

Праћењем кроз време патофизиолошких процеса који се одигравају у запаљенском одговору изазваном карагенином уочава се да се у наредној фази очекује ослобађање простагландина и то након два до три сата по апликацији. Потенцијал екстракта да ублажи инфламацију вероватно се базира на могућности да делује на неки од преходно описаних медијатора, на пример инхибицијом миграције леукоцита или синтезе простагландина (123).

Број студија које су се бавиле испитивањем антиинфламаторног ефекта сремуша је ограничен и потенцијал ове биљке у лечењу болести праћених израженим инфламацијским одговором није довољно истражен. Претходна студија је испитивала утицај екстракта сремуша на инфламацију изазвану терпентинским уљем и уочено је да ова биљка може ублажити штетне последице инфламације путем инхибиције фагоцитозе смањењем-оксидативног стреса (70). Извештаји сведоче о оксидационом стресу као фактору који подстиче развој инфламације изазване карагенином. Наиме показао је да у овом моделу инфламације долази до генерисања H_2O_2 , O_2^- , OH^- који додатно оштећују ткиво па се намеће претпоставка да би антиоксиданси могли остварити благотворне ефекте. Током инфламације активација макрофага и леукоцита утиче на NADPH оксидазу једног од главних биолошких извора прооксиданаса (124). Полифеноли испољавају импозантну антиоксидациону активност која делимично може ублажити инфламациони одговор и објаснити наше резултате.

Компоненте сремуша из групе органосумпорних једињења попут алицина, S-пропаргил-цистеина и DATS-а могу испољити антиинфламацијско деловање, међутим у нашој студији фокус је на полифенолима обзиром примењену методу екстракције. Наиме, у литератури се наводи да је једно од најзначајнијих једињења за испољавање антиинфламаторног одговора управо кверцетин-3-О-гликозид, једињење из групе полифенола (125). И кверцетин и његови деривати испољавају снажну антиинфламаторну и антиоксидациону активност што се објашњава присуством две антиоксидантне фармакофоре унутар молекула. Студије на анималним моделима показале су да кверцетин смањује ниво TNF- α , IL-6, циклооксигеназе 2, C реактивног протеина, а такође инхибира активацију транскрипционог фактора 1 што резултује инактивацијом NF- κ B и смањењем проинфламаторних цитокина (124). Додатно, претходна студија указује на антиинфламациони потенцијал р-кумаринске киселине као једне од доминантних компонената нашег екстракта. Механизам путем ког ово биоактивно једињење ублажава запаљење ткива може бити спречавање инфилтрације ћелија као и смањење нивоа проинфламаторних цитокина, TNF- α и IL-6 (126).

С обзиром на то да екстракт сремуша садржи различита једињења, претпостављамо да више једињења из групе полифенола има улогу у терапијском ефекту. Ова студија је дала базичне информације о антиинфламацијском ефекту сремуша, међутим разјашњавање механизма одговорних за ову активност биће предмет будућих студија. Природни производи и једињења изолована из биљака представљају ново недовољно истражено поље са обећавајућим лековитим потенцијалом. Будуће студије требало би да се оријентишу ка испитивању уноса сремуша у циљу лечења системских хроничних болести повезаних са инфламацијом. С друге стране, инкорпорирање природних производа на бази сремуша у топикалне препарате попут масти, крема, гелова пружа нови приступ у дермокозметичкој индустрији. Овакви препарати би били безбеднији у односу на тренутно доступне на бази кортикостероида, а ефикасни у лечењу атопијског дерматитиса и сличних стања где је циљ ублажити запаљенски одговор.

5.4. Утицај екстракта сремуша на маркере оксидационог стреса у крви пацова

И поред значајних напредака у развоју дијагностичких и терапијских стратегија за пацијенте са КВБ, оптималан алгоритам и даље није пронађен. Додатно, нежељени ефекти доступних лекова и даље представљају важан проблем за здравствени систем и у многоне ограничавају терапију код пацијената са кардиоваскуларним патологијама. Током последње две деценије у фокусу интересовања налазе се полифеноли као природни антиоксиданси који су нарочито важни за болести које су повезане са повишеним оксидационим стресом као што су кардиоваскуларне, неуродегенеративне болести, дијабетес мелитус, малигне болести итд (127, 128). Претходна истраживања указују на антиоксидациони потенцијал сремуша, али и даље нема довољно података о томе на који начин сремуш може изменити прооксидационе и антиоксидационе параметре у крви пацова. Посебна новина ове студије огледа се у праћењу утицаја екстракта сремуша на системски редокс статус здравих и хипертензивних пацова.

5.4.1. Утицај екстракта сремуша на маркере оксидационог стреса у крви здравих пацова

Праћењем утицаја четворонедељне примене метанолног екстракта сремуша на параметре оксидационог стреса желели смо да испитамо на који начин сремуш може изменити системску концентрацију прооксиданаса. Наши резултати су открили да постоји значајно смањење свих маркера оксидационог стреса након примене екстракта сремуша у дози од 500 mg/kg у односу на нетретиране пацове. Такође, унос екстракта у дози од 250 mg/kg био је повезан је смањењем вредности O_2^- , H_2O_2 и TBARS, док је најнижа доза довела је до смањења концентрације TBARS и H_2O_2 у поређењу са контролним пацовима. Поређењем вредности прооксиданаса између група на третману различитим дозама уочавају се ниже вредности свих маркера након третмана екстрактом у највишој у односу на најнижу дозу. Када је реч о параметрима антиоксидационе заштите, примена екстракта сремуша у највишој дози успела је да доведе до статистички значајног повећања вредности SOD у односу на контролне услове, док је примена у најнижој дози довела до значајног скока у вредности CAT. С друге стране, ниво GSH није се значајно мењао након четворонедељног уноса сремуша у све три дозе.

Сматра се да се антиоксидациона активност *Allium* врста приписује садржају различитих полифенолних једињења, једињења која садрже сумпор, влакана, микроелемената. Доминантна једињења у сремушу су органосумпорна једињења као што су алил метил дисулфид, алил метил трисулфид, алил-1-пропенил дисулфид. Показано је да су цистеин сулфоксидна једињења и њихови секундарни метаболити значајни за повећање антиоксидационог капацитета сремуша. Ови биомолекули помажу у процесу уклањања слободних радикала, заустављања реакције пероксидације липида и могу утицати на повећање активности антиоксидационих ензима (129). У претходно спроведеној студији откривено је да сремуш има боља антиоксидациона својства у поређењу са другим *Allium* врстама. Метанолни екстракт који је имао највиши ниво укупних полифенола, танина и флавоноида издвајао се са најбољим антиоксидационим ефектом, док су водени и етанолни екстракти имали мањи антиоксидациони ефекат. Резултати ове студије јасно указују на способност наведене биљне врсте у уклањању слободних радикала, која је свакако мање потентна од коришћених стандарда-бутил хидрокситолуена и бутил хидроксианизола. (130).

Међутим наведена студија је тестирала *in vitro* антиоксидациону активност сремуша за разлику од наше студије која је пратила утицај *in vivo* примене на маркере из крви пацова. Предност *in vivo* студија у процени ефикасности полифенола је и та што се узима у обзир биолошка расположивости полифенола. Наиме, метаболизам полифенола може умањити његово терапијско деловање што се не може детектовати *in vitro* тестовима.

У студији аутора *Moodley* и сарадника праћен је ефекат сремуша на оксидациони стрес код пацова са хемијски изазваним дијабетесом. Оксидациони стрес код ових животиња настаје због повећаног стварања слободних радикала и смањеног антиоксидативног статуса и верује се да је кључни фактор у патогенези и прогресији болести. Доступни докази снажно указују на то да стварање слободних радикала поспешује повишена концентрација глукозе у крви, аутооксидација глукозе и гликолизација протеина. (131). Међутим, третман метанолним екстрактом сремуша у дози од 60 и 120 mg/kg довео је до значајног повећања активности ензима SOD, CAT док је ниво TBARS-а у јетри био смањен. На овај начин је потврђена способност сремуша да смањи оксидациони стрес у условима дијабетеса, што је у сагласности са нашим протективним ефектима (132)

У студији аутора *Meneguzzo* и сарадника откривено је да је антиоксидациона активност сремуша била највећа у листовима због високе активности антиоксидационих ензима који су показали способност ка редукцији H_2O_2 и других органских пероксида. На тај начин пружа се заштита ћелијских протеина и мембране од оксидације (133). Додатно, луковице сремуша су показивале највећу активност SOD. Лишће је такође садржало високе количине неензимских антиоксиданаса што је још један показатељ да је ова биљка моћан извор природних антиоксиданаса. Наведене студије, иако другачијег дизајна, су у сагласности са нашим сазнањима која потврђују антиоксидациони потенцијал сремуша.

Антиоксидациона својства екстракта сремуша у нашој студији могу се објаснити присуством флавоноида и фенолних компонената које делују као снажни антиоксиданси. Антиоксидациони ефекат полифенола базира се на њиховој способности да буду донори водониковог атома, при чему настају мање реактивни феноксил-радикали (134). Флавоноиди у биљкама делују као хватачи слободних радикала (енгл. *free radical scavengers*) и претварају их у мање реактивне врсте или везују јоне метала који су иницијатори реакција оксидације. Уклањање O_2^- и OH^- под утицајем флавоноида спречава иницијацију липидне пероксидације па је интегритет липидне мембране очуван (135). У сремушу се такође налазе и хидроксицинамати и хидроксибензоати који су показани као ефикасни у неутрализацији OH^- , O_2^- и $NOOO^-$. Испитивањем антиоксидативног потенцијала листа сремуша утврђено је да антиоксидативно деловање сремуша није повезано само са присуством фенолних једињења већ и да активност антиоксидационих ензима значајно доприноси целокупном оствареном ефекту (136). Иако су полифеноли кључни за испољавање антиоксидационог деловања екстракта сремуша, у одређеној мери и каротеноиди могу утицати. Каротеноиди су такође доказани у екстрактима сремуша и представљају групу пигмената који делују као хватачи синглет-кисеоника и слободних радикала способних да иницирају липидну пероксидацију (136). Присуство свих претходно споменутих биоактивних једињења може допринети укупном антиоксидационом ефекту метанолног екстракта сремуша у нашем истраживања.

Генерално гледано, резултати наше студије показују да је примена сремуша довела до значајног смањења у вредностима испитиваних параметара оксидационог стреса, што је у сагласности са претходно поменутих студијама. Основне разлике ове у односу на претходно поменуте студије огледају се у нешто другачијем

експерименталном приступу, тачније разлика је у дужини трајања третмана овом биљком као и то што је поред метанолног коришћен водени екстракт сремуша као и етарско уље сремуша. Док је у нашој студији то била тронедељна примена, у претходним студијама је то била једнократна или вишемесечна примена екстракта ове биљке.

5.4.2. Утицај екстракта сремуша на маркере оксидационог стреса у крви спонтано хипертензивних пацова

Оксидациони стрес је препознат као један од основних механизма одговорних за развој хипертензије. Бројни подаци указују на јаку повезаност између повећане концентрације РОС и смањене расположивости NO и развоја и прогресије хипертензије (137, 138). У том смислу, наш циљ је био и да испитамо утицај сремуша на редокс равнотежу код хипертензивних пацова. Раније је потврђено да механички стимулуси на васкуларном зиду могу покренути стварање прооксиданаса. Такође, повећање концентрације РОС доводи до вазоконстрикције што додатно погоршава хипертензију. Имајући у виду претходно наведени утицај РОС на васкуларни зид, истраживачи су се окренули ка примени антиоксиданаса у превенцији и контроли високих вредности крвног притиска (139). Наши резултати јасно показују да је највећа доза екстракта сремуша остварила изражен антиоксидациони ефекат који је потврђен смањењем већине мерених прооксиданаса у односу на контролне животиње. Више вредности прооксиданаса код хипертензивних пацова без третмана указују на капацитет екстракта у највишој дози да измени редокс равнотежу и оствари значајне бенефите. Додатно, четворонедељни унос средње дозе екстракта (250 mg/kg) довео је до значајног пада вредности TBARS и NO₂⁻, док је најнижа доза довела до пада у концентрацији H₂O₂. Када је реч о маркерима антиоксидационе заштите, третман екстрактом сремуша у дози од 500 mg/kg довео је до повећања активности ензима SOD у односу на контролне услове, тј. хипертензивне нетретиране пацове и пацове који су били на третману најнижом дозом. Генерално посматрано у све три групе екстракт сремуша није утицао на вредности CAT и GSH.

Протективни ефекти запажени у овој студији могу се приписати полифенолима који се налазе у метанолном екстракту сремуша. Непромењене вредности O₂⁻ у корелацији су са повећањем активности SOD код пацова на третману највишом дозом. Прва линија антиоксиданаса укључује између осталог и ензим SOD који је неопходан у неутрализацији O₂⁻. Снижење нивоа TBARS након примене дозе од 500 и 250 mg/kg указује на потенцијал екстракта сремуша да ублажи пероксидацију липида. Овај ефекат је нарочито важан јер током липидне пероксидације долази до настанка алкокси и перокси радикала. Сматра се да је липидна пероксидација кључни догађај који доприноси развоју кардиоваскуларних болести па би биљке или једињења изолована из биљака са капацитетом да спрече пероксидацију липида могла остварити значајну кардиопротекцију (140). Један од фактора који утиле на потенцијал сремуша да спречи пероксидацију је поларност компонената екстракта. Растворљивост у води и липидима одређује степен у ком ће једињење проћи у липидну фазу где се одвија пероксидација и испољити свој ефекат (140). На основу наведеног може се претпоставити да су биоактивни полифеноли са вишим вредностима партиционог коефицијента одговорни за ефекте сремуша на липидну пероксидацију у нашој студији.

Конзумација екстракта сремуша у средњој и највишој дози довела је до смањења NO₂⁻, као индиректног маркера NO. Овај ефекат је од посебног значаја у хипертензији имајући у виду да NO има важну улогу као кључни паракрини регулатор васкуларног тонуса. У физиолошким условима NO инхибира адхезију леукоцита за ендотелне ћелије

и агрегацију тромбоцита у циљу очувања васкуларног ендотела. С друге стране, смањење расположивости NO повезано је са смањеним капацитетом за вазодилатацију што доприноси хипертензији (141). У овом истраживању ниже вредности TBARS, NO₂ и H₂O₂ биле су уочене у групи пацова на третману највишом у односу на најнижу дозу екстракта сремуша указујући на интензивнији антиоксидациони ефекат више дозе.

Ефекти третмана екстрактом сремуша на системски редокс статус могу се објаснити помоћу присутних једињења из групе полифенола. Механизми одговорни за антиоксидационе ефекте су делимично претходно описано када су тумачени резултати који се тичу здравих пацова. Сматра се да је доминантни механизам антиоксидационог деловања полифенола директна неутрализација слободних радикала. С друге стране, више дозе могу утицати и на активност антиоксидационих ензима, што је и у корелацији са нашим налазом (142). Бројни подаци указују на велики здравствени бенефит уноса полифенола код хипертензивних пацијената због јако израженог антиоксидационог деловања. У фокусу наше студије није био утицај екстракта сремуша на вредности крвног притиска, већ на системску редокс равнотежу која је свакако нарушена у условима хипертензије. Будуће студије би могле пратити утицај екстракта сремуша на маркере оксидационог стреса и успоставити корелацију са вредностима крвног притиска. Такве информације би помогле развоју оптималног алгорита за унос полифенола путем намирница и превенције и контроле хипертензије и придружених кардиоваскуларних компликација.

5.5. Ефекти екстракта сремуша на И-Р повреду изолованог срца пацова

Велика смртност од инфаркта миокарда подстиче научнике широм света да континуирано истражују могуће терапијске стратегије које би спасила ове пацијенте. Недостатак већине широко коришћених лекова за третман кардиоваскуларних болести је појава нежељених ефеката што захтева проналазак терапијског приступа који би био ефикасан и безбедан. Постоји податак да се око 50 000 биљака користи у фармацеутске сврхе, а око 80% светске популације користи традиционалне лекове у превенцији и лечењу болести. Биљке у целости као и једињења изолована из биљака показали су се ефикасним у великом броју кардиоваскуларних патологија, а њихова предност огледа се у нижој цени и бољем безбедносном профилу у односу на синтетске лекове. Велика улога биљака у здравственом систему приписује се највише присуству једињења из групе полифенола. Полифеноли се истичу као изузетно корисна једињења у очувању здравља и терапији болести срца и крвних судова. Антиоксиданси биљног порекла заузимају све важније место у здравственој заштити јер је њихов терапијски потенцијал потврђен у бројним фитохемијским, биолошким и клиничким студијама током прошлог века (143-145).

Предуслов за проналазак оптималног терапијског протокола представља свеобухватно разумевање свих патолошких процеса који се дешавају током исхемије и реперфузије. Добро је познато да је срчана дисфункција често повезана са повишеним нивоом РОС или РНС што је показано у моделима И/Р повреде и хируршки изазваном инфаркту миокарда. У том смислу, унос антиоксиданаса путем исхране налази се у фокусу интензивног испитивања због потенцијала да модулирају редокс сигнализацију, пружајући тако кардиопротекцију. Бројне претклиничке и клиничке студије показале су да је унос полифенола који су присутни у јестивим биљкама попут сремуша, повезана са смањењем кардиоваскуларног ризика. Велики терапеутски потенцијал полифенола и екстраката који садрже полифеноле приписује се њиховим антиоксидативним, имуномодулаторним, антиинфламаторним и вазодилаторним активностима.

Показано је да правилна исхрана има велики значај у промоцији здравља и превенцији болести, а с тим у вези биљке које се користе у исхрани представљају важан допринос у смањењу ризика од болести срца и крвних судова. Епидемиолошке студије указују на повезаности између специфичног начина исхране и кардиоваскуларног здравља, па се у фокусу истраживања последњих година налазе јестиве биљке које садрже компоненте са кардиопротективним својствима (146). Биљке из рода *Allium* се вековима користе у исхрани људи и њихови бенефити на кардиоваскуларни систем су потврђени на анималним моделима и у клиничким студијама. Међутим, за сада нема довољно информација у вези са ефектима сремуша на И/Р повреду и улога ове биљке у заштити срца након исхемије није проучена. Имајући у виду хемијски састав обе биљке, претпоставили смо да би секундарни метаболити присутни у овој биљној врсти могли помоћи у спашавању миокарда изложеног исхемији. Стога је циљ ове студије био да процени ефекте екстракта листа сремуша у маневру прекондиционирања на моделу изолованог срца пацова. Посебна актуелност ове студије огледа се не само у процени, већ и поређењу ефикасности конзумације екстракта сремупа у три дозе у циљу издвајања најоптималније дозе за ублажавање И-Р повреде срца.

За изучавање ефеката сремуша на функционални оправак миокарда користили смо модел ретроградне перфузије изолованог срца по *Langendorff*-у. У литератури се наводи да *in vivo* модели И-Р повреде нису довољно ефикасни за проучавање функционалних ефеката повреде у реалном времену, док се детаљне информације могу прикупити у *ex vivo* студијама попут наше. Кардиодинамски параметри праћени у овој студији одражавају функционалне карактеристике срца, посебно леве коморе. Праћењем систолне и дијастолне функције леве коморе као функционално и морфолошки доминанте могу се добити корисне информације о утицају сремуша на целокупну функцију миокарда. Ефекти четворонедељне конзумације екстракта сремуша на кардиодинамске параметре истичу његову потенцијалну терапијску улогу у моделу прекондиционирања.

5.5.1. Ефекти екстракта сремуша на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца здравих пацова након И-Р

Резултати наше студије показали су да је исхемија након које следи реперфузија проузроковала пад вредности $dp/dt \max$, $dp/dt \min$ и SLVP на крају реперфузије у односу на период стабилизације. Наведени резултат указује на погоршање контрактилности и релаксације миокарда, као и систолне и дијастолне функције што је у складу са литературом. Бројне студије су истакле да је успостављање протока кроз ткиво након исхемије доводи до акумулације Ca^{2+} , екстрацелуларног K^+ , што синергистички погоршава контрактилну снагу срца (147). Такође, у контролној групи забележен је пад фревенце и коронарног протока у последњем моменту реперфузије што додатно потврђује да реперфузија парадоксално погоршава рад срца.

С друге стране, већина кардиодинамских параметара у групи третираној екстрактом сремуша у најнижој дози није се мењала током посматраног периода. Одсуство промена параметара срчане функције указује на потенцијал екстракта сремуша у дози од 125 mg/kg да омогући срцу несметан рад у реперуфзији. Једино је дошло до пада вредности DLVP и SLVP на крају реперфузије што указује на умањење дијастолног и систолног капацитета срца. Наведено смањење систолне функције мање је у односу на нетретиране пацове где су забележене ниже вредности SLVP на крају реперфузије у односу на пацове на третману. На основу наведеног уочава се да нижа

доза није у потпуности успела да превенира губитак систолне и дијастолне функције, али је свакако у одређеном степену ублажила оштећење.

Додатно, примена екстракта у дози од 250 mg/kg успела је да спречи варијације у вредностима параметара срчане функције што указује на очуван одговор миокарда на И-Р. Највиша доза сремуша није само превенирала депресију срчане функције, већ је успела и да побољша контрактилни капацитет срца што је верификовано скоком у параметру dp/dt у последњем минути реперфузије у односу на стабилизацију. Такође вредности скоро свих параметара биле су више у групи изложеној третману у највишој дози у односу на нетретирание. Забележене вредности кардиодинамских варијабли у нашој студији указују на сигнификантну улогу сремуша у маневру прекондиционирања срца.

Кадиопротективни ефекти сремуша уочени у нашем истраживању су у корелацији са претходним истраживањима. Претходна студија пратила је утицај сремуша на осетљивост срца на вентрикуларне аритмије у условима срчане исхемије и реперфузије. Према нашим сазнањима наведена студија спроведена пре скоро 3 деценије је прва која је пратила ефекте конзумирања сремуша на И-Р повреду срца, при чему су аутори такође користили модел перфузије изолованог срца по *Langendorff*-у. Показано је да унос хране обогаћене сремушем у периоду од 8 недеља смањује инциденцу вентрикуларне фибрилације, зону инфаркта након исхемије срца. Предложени механизми одговорни за кардиопротекцију подразумевају утицај сремуша на АЦЕ ензим, док систем простагландина није значајан за ефекте ове биљне врсте (65). Такође, друга студија пратила је утицај лиофилизата сремуша на срчану функцију одраслих мушких новозеландских зечева са изазваном хиперхолестеролемијом. Резултати овог истраживања показали су да лиофилизат листа дивљег белог лука побољшава функцију изолованог срца што је манифестовано значајно већим постисхемијским вредностима протока аорте у односу на нетретирание пацове. Такође, ехокардиографска мерења сугеришу да је код животиња са хиперхолестеролемијом које су конзумирале сремуш побољшана дијастолна функција. Побољшање дијастолне функције уочено у описаној студији је у корелацији са нашим сазнањима и од изузетног је значаја за рад срца. Наиме протективан утицај дијастолну функцију срца је нарочито битан имајући у виду да фаза релаксације одређује пуњење срца и у крајњем срчани рад (148). Описане студије су према нашим сазнањима једине које указују исхрана базирана на сремушу може деловати протективно на срца изложена исхемији.

Обзиром на лимитиран број студија који се бавио наведеном проблематиком и улогом сремуша у И-Р срца, добијене резултате можемо објаснити на основу хемијског састава и једињења са познатим кардиопротективним својствима. HPLC анализа метанолног екстракта сремуша указала је на то да су најзаступљенија полифенолна једињења кемпферол 3-O-Glc, р-кумаринска киселина, ферулинска киселина, кемпферол. Бројни литературни подаци сведоче о импозантном кардиопротективном потенцијалу сумпорних једињења која се налазе у сремушу. Међутим, како што је и претходно описано, сумпорна једињења се ослобађају повредом биљног ткива, односно поступком сечења и обраде биљке. Складиштење сремуша током времена индукује губитак испарљивих биоактивних молекула који садрже сумпор, али не фенолних једињења. У том смислу, налази нашег истраживања одражавају потенцијал за употребу сремуша током целе године, не само у периоду цветања. Због тога се ефекти екстракта сремуша на кардиоваскуларни систем приписују присутним полифенолима, пре него сумпорним једињењима која би била значајна да се сремуш конзумира у свежем стању.

Протективни ефекти полифенола на контрактилну моћ срца могу се објаснити утицајем на Ca^{2+} -АТФ-азу- SERCA2а пумпу. Познато је да преоптерећење Ca^{2+} због

преузимања Ca^{2+} из цитосола у сакроплазматски ретикулум посредством SERCA2a доприноси срчаној дисфункцији у И-Р. У том смислу, полифеноли деловањем на SERCA2a пумпу поспешују повратак интрацелуларних Ca^{2+} резерви што пружа довољну количину Ca^{2+} за наредну контракцију (149-151). Позитиван утицај полифенола на хомеостазу Ca^{2+} нарочито је битан за унапређење контрактилног капацитета миокарда и превенцију аритмија. Бројни подаци сведоче о благотворном деловању полифенола на кардиоваскуларни систем које је последица антиинфламацијске, антиоксидационе активности што побољшава структуру и функцију ендотела (152).

Наши резултати су показали и да унос сремуша током четири недеље може да сачува коронарни одговор што се манифестује константним вредностима коронарног протока. Наведени резултат може се објаснити деловањем полифенола на биоискористљивост NO. Заправо NO представља један од најпотентнијих ендогених вазодилататора који настаје из L-аргинина под утицајем три изоформе NO синтазе (NOS). С једне стране, конститутивне NOS утичу на настанак малих количина NO које су значајне за одржавање микроваскуларног тонуса. Међутим, друге изоформе као што су индуцибилне NOS (iNOS) непожељне су јер се њихова активација бележи у патолошким условима попут инфламације. Потенцијално објашњење за постизање ефекта сремуша на коронарни проток може се приписати полифенолима који могу повећати биорасположивост NO активирањем ендотелне, конститутивне NOS (eNOS). Литературни подаци сугеришу да је активност eNOS смањења у исхемији која дуго траје што значајно нарушава систолни и дијастолни капацитет миокарда, док повећање експресије под утицајем полифенола може пружити јасне бенефите миокарду.

5.5.2. Ефекти екстракта сремуша на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца хипертензивних пацова након И-Р

Посебна актуелност ове студије базира се испитивању ефеката хроничне примене екстракта сремуша на моделу хипертензивних пацова. Код пацијената са хипертензијом долази до специфичних функционалних и морфолошких промена срца које значајно угрожавају његов рад (153). Наиме увећање коморе код хипертензивних пацијената не односи се само на миоцитну хипертрофију, већ и на повећано вентрикуларно интрамурално таложјење протеина и колагена у екстрацелуларном матриксу коморе. Ове промене узрокују измене у функцији леве коморе попут смањеног коронарног протока у мировању. Као резултат повећане потребе за коронарним протоком крви, коронарни проток у мировању и коронарни васкуларни отпор хипертензивне леве коморе су смањени (154). Одабир модела хипертензивних животиња у нашој студији био је заснован на широко прихваћеној повезаности између повишеног крвног притиска и АМИ у општој популацији. Пацијенти са АМИ врло често имају дугу историју хипертензије, а код хипертензивних пацијената прогноза инфаркта је лошија (153). Због тога смо желели да испитамо да ли хронична примена екстракта сремуша може остварити бенефите на срчану функцију хипертензивних животиња.

Наши резултати показују да је унос екстракта сремуша у најнижој дози био повезан са непромењеним вредностима $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$ на крају реперфузионог периода у односу на стабилизацију. Овај налаз указује на способност најниже дозе да очува контрактилну и лузитропну моћ срца. С друге стране, забележен је пад коронарног протока што сугерише да екстракт сремуша у овој дози није био довољан да у потпуности очува коронарни вазодилататорни одговор срца. Међутим, када се упореде вредности у третираној и контролној групи јасно се уочава скок у параметру

dp/dt max, dp/dt min, DLVP и CF у последњем моменту реперфузије код пацова који су конзумирали сремуш, што потврђује протективне ефекте ове биљне врсте на срчану функцију.

У групи која је била на третману средњом дозом екстракта забележене су значајно више вредности dp/dt min и HR на крају реперфузије у односу на нетретирани пацове. Наведени резултат указује на способност сремуша у дози од 250 mg/kg да спречи погоршање релаксације срца услед исхемије. Такође, више вредности срчане фреквенце омогућавају срцу несметан рад. Након четворонедељног уноса сремуша у дози од 500 mg/kg уочавајусе најизраженији бенефити на функционални опоравак миокарда. Наведени ефекти су потврђени одуством промена у вредностима кардиодинамских параметара и коронарног протока што указује на то да је срце очувано и није било флукуација које би му ометале рад.

Док су кардиопротективна својства белог лука добро проучена, терапијски потенцијал сремуша или медвеђег лука тек треба да се истражи. Досадашња испитивања која се тичу повезаности сремуша и хипертензије базирана су на утицају ове биљке на регулацију крвног притиска. Показано да препарати сремуша смањују крвни притисак и инхибирају АЦЕ на спонтано хипертензивним пацовима. Инхибиција АЦЕ под утицајем сремуша је израженија него у случају примене белог лука. Међутим, према нашим сазнањима нема студија које су пратиле ефекте сремуша на срчану функцију у условима повишеног крвног притиска. Генерално гледано, хипертензија значајно повећава оптерећење миокарда, што резултира задебљањем и укрућењем и у крајњем погоршањем срчане функције. Бројне студије су потврдиле да промене у начину живота, укључујући исхрани богату полифенолима могу допринети превенцији и контроли високог крвног притиска, а самим тим и смањењу ризика од кардиоваскуларних патологија. Поред хипотензивног ефекта, полифеноли могу деловати антиагрегационо и побољшати ендотелну функцију (155).

5.5.3. Ефекти екстракта сремуша на срчани редокс статус код здравих пацова након И-Р

Бројна истраживања су потврдила да је повишен оксидациони стрес присутан у периоду И-Р. Реперфузија исхемијског ткива парадоксално узрокује ослобађање прооксиданаса што још више оштећује рад миокарда. У том смислу, примена антиоксиданса у маневру прекондиционирања срца представља обећавајући приступ у умањењу штетних последица И-Р повреде (156).

Наши резултати су показали да је у групи здравих и спонтано хипертензивних пацова забележен пораст свих маркера оксидационог стреса на крају реперфузије у односу на стабилизацију. Овај налаз је у корелацији са литературним подацима који истичу да су реактивне кисеоничне и азотне врсте кључне у развоју и прогресији И-Р оштећења (157, 158). Поновно успостављање протока у исхемијски миокард подстиче накупљање прооксиданаса које даље утиче и на развој инфламационог одговора. Као резултат ткиво срца је оштећено и његова функција и структура су нарушени.

Код пацова који су користили екстракт сремуша у најнижој дози уочава се одржавање вредности прооксиданаса релативно константним током посматраног периода. Забележени су благи скокови у концентрацији појединих прооксиданаса, али су се вредности до краја реперфузије повратиле. Једино ниво TBARS на крају реперфузије није успео да се врати у почетне вредности које су забележене у стабилизацији. С друге стране, третман екстрактом у дози од 250 mg/kg успео је не само да спречи флукуације у вредностима прооксиданаса, већ је довео и до снижења

свих маркера у односу на стабилизациони период. Сличан тренд уочен је и након примене највише дозе екстракта сремуша где није уочена значајна промена вредности прооксидационих маркера током посматраних тренутака времена, док је на крају реперфузије забележен значајан пад TBARS, NO_2^- и O_2^- у односу на контролну нетретирану групу. Поређењем ефеката растућих доза екстракта сремуша уочава се да су све три дозе показале сличан потенцијал ка умањењу срчаног редокс статуса здравих пацова, при чему се средња доза издваја незнатно већим антиоксидационим ефектом.

Потенцијал екстракта сремуша да измени ниво TBARS рефлектује улогу ове биљне врсте у пероксидацији липида. Третман екстрактом сремуша у зависности од примењене дозе успео је да одржи и/или умањи ниво TBARS чиме се спречава оксидација ДНК и протеина и оштећења мембране. Нарушавање структуре мембране услед липидне пероксидације доводи до промена у пропустљивости мембране и нарушавању структуре и функције протеина. С друге стране, екстракти су успели да спрече пораст O_2^- који је једна од најреактивнијих РОС врста. Сматра се да у реперфузији долази до активације ксантин оксидазе у ендотелним ћелијама, а такође под утицајем NADPH оксидазе присутне у кардиомиоцитима долази до екцесивног накупљања проксиданаса (97).

Наши резултати се могу објаснити хемијским саставом екстракта сремуша и деловањем полифенола. Као што је објашњено у делу дискусије која се бави ефектима сремуша на системску редокс равнотежу, утицај полифенола највероватније је последица директне неутрализације прооксиданаса и модулације антиоксидационих ензима заштите. Протективни ефекти екстракта сремуша на функцију срца су у корелацији са резултатима кардиодинамике и потврђују значај ове биљне врсте у кардиопротекцији.

5.5.4. Ефекти екстракта сремуша на срчани редокс статус код хипертензивних пацова након И-Р

Велики број истраживања потврдио је улогу оксидационог стреса у патогенези хипертензије, па се све већа пажња лекара усмерава ка имплементацији антиоксиданаса као адјувантне терапије. На овај начин би се ублажиле структурне, функционалне и ендотелне патофизиолошке промене изазване делимично оксидационим стресом које мењају коронарну хемодинамику и функцију коморе (153). Дуготрајна примена антиоксиданаса могла би да унапреди срчану функцију, а уједно и смањи оштећења уколико настане исхемија. У циљу проналаaska ефикасне суплементације антиоксидансима превасходно треба расветлити целуларне и молекулске механизме укључене у настанак оксидационог оштећења срца након исхемије-реперфузије. Оксидациони стрес је издвојен као један од најважнијих догађаја у самом реперфузионом оштећењу срца будући да у првим минутима повратка протока крви у миокард долази до стварања прекомерне концентрације РОС. Настале РОС оштећују кардиомиоците, а познавањем њиховог извора и одабиром адекватног антиоксиданса у профилакси, миокард би се могао заштитити од глобалне исхемије (159, 160). Зато смо желели да испитамо да ли четворнедељна примена метанолног екстракта сремуша, који је богат природним антиоксидансима из групе полифенола, у три дозе може ублажити оксидациона оштећења срца.

Вредности прооксиданаса нису значајно варирале током експерименталног протокола у групи спонтано хипертензивних пацова на третману екстрактом сремуша у све три дозе указујући на сигнификантну улогу ове биљне врсте у превенцији оксидационог оштећења срца. Наведени резултат указује на добар одговор срца на

реперфузију и последично одсуство штетних ефеката прооксиданаса. Поређењем концентрације прооксиданаса између група на третману и нетретираних животиња уочава се да је унос екстракта у све три дозе довео до значајног снижења TBARS на крају реперфузије, док је средња доза успела да снизи и ниво нитрита. Потенцијал све три дозе екстракта спремуша да умањи пероксидацију липида значајно је са аспекта спречавања оштећења мембране ћелије. Поновно успостављање протока кроз срце подстиче ензим ксантин оксидазу у ендотелним ћелијама, као и никотин амид аденин динуклеотид фосфат (NADPH) оксидазе - NOX што води ка ослобађању слободних радикала. NOX је значајан извор ROS у крвним судовима, а њена повећана експресија присутна је у хипертензији и повезана са генерисањем радикалских врста (161). Важно је пратити и L-аргинин-NO систем јер се измена у функционисању појединих компонената одражава на функцију срца. Наиме eNOS ствара NO из L-аргинина, међутим у одређеним патолошким околностима eNOS може пренети електроне са NADPH на молекулски кисеоника уместо L-аргинина. У том случају настаје једна од најреактивнијих радикалских врста O_2^- (162). Одсуство промена у концентрацији O_2^- у нашој студији указује на потенцијал једињења која улазе у састав екстракта да делују на неки од наведених ензимских извора прооксиданаса и тиме спрече њихово настајање. С друге стране, одговор можда лежи и у директној неутрализацији насталих прооксиданаса од стране полифенола. Обзиром на то да у овој студији због методолошких недостатака нисмо били у могућности да пратимо утицај на антиоксидансе из срчаног ткива не можемо извести прецизан закључак који механизам утиче на превенцију оксидативног оштећења миокарда након примене спремуша.

Велики истраживачки напори су последњи година оријентисани ка утицају антиоксиданаса у бројним хроничним болестима. Наши резултати су у складу са литературом и указују на то да примена антиоксиданаса пре исхемије-реперфузије може повећати толеранцију срца и значајно унапредити функционални опоравак. У циљу постизања заштите функције и морфологије срца од круцијалне важности је одабрати оптималну дозу која би била успешна у модулацији редокс сигнализације.

5.6. Ефекти екстракта спремуша на морфологију органа пацова

5.6.1. Ефекти екстракта спремуша на морфологију бубрега пацова

Испитивање утицаја спремуша на морфологију бубрега здравих пацова спроведено је са циљем да се испита да ли постоји одређени ефекат хроничне конзумације екстракта на здрави бубрег. Показано је да није дошло до промена у структури бубрега, тј. бубрези су остали очуване грађе што указује на одсуство токсичних ефеката биљке на овај орган. С друге стране, посматрање бубрега хипертензивних пацова било је од нарочитог интереса будући да је хипертензија повезана са развојем нефропатије. Наиме, повезаност хипертензије и оштећења бубрега је научно потврђена и сматра се да повишене вредности крвног притиска могу довести до бенигне и малигне нефросклерозе (163). У складу са литературом, у групи хипертензивних нетретираних пацова уочена је атрофија гломерура, проширен уринарни простор, као и фокална десквамација епитела са појединачним пикнотичним једрима у сабирним тубулима. Највиша доза екстракта спремуша показала је значајан капацитет да ублажи структурне промене изазване хипертензијом што је верификовано налазом очуваних гломерула, уз благе промене епитела проксималних тубула. Претходна студија испитивала је ефекте уноса полифенола на реналну функцију код

спонтано хипертензивних пацова. Откривен је бенефит ових природних једињења на хистопатолошке параметре бубрега. Хипертензија на моделу SHR животиња јавља се услед повишеног периферног васкуларног отпора, који прво стварају неуронски и бубрежни фактори. Додатно, структурне васкуларне бубрега јављају се услед повишене синтезе васкуларних протеина након одређеног временског периода односно хроничног повишења крвног притиска (164, 165). Такође, адекватна контрола тензије је од нарочитог значаја у циљу спречавања протеинурије и гломерулосклерозе, а претходне студије управо потврђују да коришћење полифенола може значајно снижити протеинурију (166). Као што је примећено, наши резултати јасно потврђују да је унос природних антиоксиданаса попут екстракта сремуша један од начина лечења оштећења бубрега изазваног хипертензијом.

5.6.2. Ефекти екстракта сремуша на морфологију јетре пацова

Један од циљева наше студије био је да испита ефекат екстракта сремуша на структурне промене јетре пацова, с посебним освртом на разлике у деловању код здравих и спонтано хипертензивних пацова. Наши резултати су показали да екстракт сремуша није довео до структурних промена јетре код здравих пацова. Хепатоцити су у свим групама здравих пацова очуване грађе и еухроматичних једара без присуства едема и вакуолизације. Међутим, код пацова са хипертензијом присутни су едем и дифузна вакуолизација хепатоцита. У литератури је описано да је су хепатоцити осетљиви на оксидациони стрес присутан у хипертензији усле високе енергетске активности и брзог исцрпљивања антиоксидативне заштите (167). С друге стране, третман метанолним екстрактом сремуша испољио је значајне бенефите у смислу умањења патолошких промена на јетри хипертензивних пацова. Код пацова на третману најнижом дозом екстракта уочени су едем и вакуолизација цитоплазме хепатоцита, али у знатно мањем обиму у поређењу са нетретираним животињама. Након третмана средњом дозом ефекти су знатно бољи што је потврђено на основу присуства почетних знакова едема и вакуолизације. Најинтензивнији протективни ефекат постигнут је након примене највише дозе која је не само умањила штетне морфолошке промене јетре, већ је у потпуности очувала њену структуру. Наиме, хистолошка анализа потврђује нормалну морфолошку грађу ткива, хепатоцити су без видљивих промена, без присуства едема и вакуолизације (у хепатоцитима је присутан гликоген). Претходне студије које су проучавале ефекте полифенола и екстраката богатих полифенолима на функцију и структуру јетре потврђују да су ова једињења испољила важна лековита својства. Механизам којим полифеноли остварују хепатопротективно деловање подразумева модулацију оксидационог стреса, повећање нивоа неензимског антиоксиданса GSH и редукцију липида јетре. Наши резултати указују на то да екстракт сремуша остварује хепатопротективни потенцијал који се највероватније може приписати полифенолима са израженим антиоксидационим деловањем. На основу наведеног екстракт сремуша се истиче као обећавајући додатак исхрани код пацијената са хипертензијом који може заштитити бубреге и јетру од неадекватно контролисане тензије, као и остварити благодети на рад срца (168, 169).

5.6.3. Ефекти екстракта сремуша на морфологију срца пацова

Реперфузија исхемијског срца повезана је не само са функционалним погоршањем рада, већ и са структурним штетним изменама које значајно нарушавају регуларан рад миокарда. Током исхемије долази до промена у срцу које могу узроковати

дисфункцију и некрозу (170). У нашој студији циљ је био испитати да ли сремуш може ублажити наведена оштећења услед И-Р и да ли су ти ефекти дозно-зависни. Имајући у виду да је у условима хипертензије рад срца додатно ослабљен, циљ је био проценити да ли сремуш може остварити кардиопротекцију у некој мери. Наши резултати су показали да код здравих нетретираних пацова након двадесетоминутне исхемије и тридесетоминутне реперфузије долази до хипертрофије појединачних мишићних влакана са присутним дегенеративних промена. Такође, уочава се хиперцелуларност строме (ћелијски инфилтрат), едем интерстицијума и пикноза једра што је у сагласности са извештајима из литературе о штетном утицају И-Р. Претходно је показано да након исхемије долази до повећања микроваскуларне пропустљивости, интерстицијског едема, оштећења вазорегулације, инфламаторне инфилтрације ћелија и дисфункције и некрозе паренхимских ћелија. Сама реперфузија иако неопходна за спасавање живота пацијената доводи до стварања и активирања различитих хуморалних медијатора запаљења и стварања слободних радикала (97). У нашој студији у групи пацова који су користили сремуш током 4 недеље уочава се значајан бољитак који се манифестује променама мањег интензитета. Срца пацова који су уносили екстракт у најнижој дози карактеришу сличне промене као у контроли, у смислу хипертрофије појединачних мишићних влакана, дегенеративних промена, хиперцелуларности строме, међутим мање изражене него код нетретираних пацова.

Нешто јачи ефекат уочен је након примене средње дозе екстракта који је верификован сличним морфолошким карактеристикама миокарда као код нетретираних пацова и пацова на најнижој дози сремуша, али мањег интензитета. Несумњиво најбољи кардиопротективни ефекат уочен је код пацова који су током 4 недеље конзумирали екстракт сремуша у дози од 500 mg/kg. Остварени бенефити су у корелацији са вредностима кардиодинамских параметара и недвосмислено потврђују највећи потенцијал највише дозе у заштити срца од И-Р повреде.

Код хипертензивних пацова без третмана биле су присутне најинтензивније штетне промене које су обухватиле хипертрофисана мишићна влакана са присуством дегенеративних промена, таласаста влакна, хиперцелуларна строма (ћелијски инфилтрат) са губитком једра и едемом интерстицијума. Код пацова третираних најнижом дозом уочено је благо смањење ових промена, у смислу промена у мањој мери. SHR групу. Доза сремуша од 250mg у значајно је побољшала структуру миокарда у односу на нетретираних пацова и пацова који су конзумирали најнижу дозу, али се и даље уочавају промене на једру у смислу појаве затупастих једара. Највећи степен смањења дегенеративних промена, хиперцелуларности строме (фокално присутан) као и едема интерстицијума са почетним променама једра уочен је у групи која је добијала највећу дозу сремуша.

На основу наведеног јасно се уочава да екстракт сремуша значајно ублажава промене на срцу које су изазване исхемијом и реперфузијом чиме се још једном истиче као потентни агенс у кардиопротекцији.

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата ове докторске дисертације може се закључити:

1. HPLC анализа метанолног, воденог и хлороформског екстракта сремуша указала је на присуство сличних полифенола у сва три екстракта, али у различитим концентрацијама као последица примене растварача различите поларности. Најзаступљенија једињења у свим екстрактима била су кемпферол 3-O-Glc, р-кумаринска киселина, ферулинска киселина, кемпферол.
2. Највиши садржај фенола и флавоноида био је присутан у хлороформском екстракту, а највећи капацитет неутрализације DPPH радикала показао је метанолни екстракт сремуша.
3. Сва три испитивана екстракта испољила су генерално слабо антибактеријско и антигљивично деловање чији је степен зависио од врсте микроорганизама и екстракта. Најизраженији антимикуробни ефекат показао је хлороформски екстракт.
4. Све испитиване дозе екстракта сремуша успеле су у одређеној мери да ублаже инфламациони процес подстакнут карагенином, међутим најбољи ефекти постигнути су након примене дозе од 200 mg/kg.
5. Унос метанолног екстракта сремуша током 4 недеље значајно је утицао на системски редокс статус путем редукције маркера оксидационог оштећења.
6. Унос метанолног екстракта сремуша током 4 недеље значајно је помогао опоравку срчане функције, нарочито контрактилне и релаксационе моћи и код нормотензивних и хипертензивних пацова.
7. Четири недеље третмана екстрактом сремуша довело је до редукције маркера оксидационог стреса из коронарног венског ефлуента, што је један од механизма за ублажавање функционалних оштећења срца током И-Р.
8. Унос сремуша током 4 недеље значајно умањује структурне промене на срцу након И-Р код здравих и спонтано хипертензивних пацова. Додатно, овај екстракт остварује бенефите и на јетру и бубрег који су у условима хипертензије били патолошки измењени.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Stearn WT. Allium. In: Tutin GT et al., eds. Flora Europea 5. Cambridge: Cambridge Univresity Press, 1980: 49–69.
2. Fritsch M, Blattner R, Gurushidze M. New classification of Allium L. subg. Melanocrommyum (Webb & Berthel.) Rouy (Alliaceae) based on molecular and morphological characters. Phytomorphology (Horn). 2010; 49:145-220.
3. Adeyemo O, Oko I, Onadipe A. Molecular diversity of 3 allium spp. local races based on rapd data and assessment of ssr markers in cross-species transferability. 2020; 729-735.
4. Hirschegger P, Jakse J, Trontelj P, Bohanec B, Origins of Allium ampeloprasum horticultural groups and a molecular phylogeny of the section Allium (Allium: Alliaceae), Molecular Phylogenetics and Evolution, 2010; 54:488-97.
5. Stearn WT. How many species of Allium are known? Curtis's Botanical Magazine.1992; 9:180–82.
6. Rejewski M. The origin of Latin names of Polish plants. Botanical guide. Prince and Knowledge, Warsaw. 1996.
7. Tomić Z. Sumske biljne zajednice u Srbiji. Beograd, Srbija. 1992.
8. Sobolewska D, Podolak I, Makowska-Wąs J. Allium ursinum: botanical, phytochemical and pharmacological overview. Phytochemistry reviews. 2015; 14(1):81-97.
9. Simin, N. Sekundarni biomolekuli u vrstama Allium sect. Codonoprasum reh. – biološke aktivnosti, fitokemijski i hemotaksonomski aspekti, doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, Serbia. 2015.
10. Kojić M, Stamenković V, Jovanović D, Lekovite biljke jugoistočne Srbije, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva. Beograd, Srbija, 1998.
11. Lanzotti, V. The analysis of onion and garlic. Journal of chromatography A. 2006; 1112(1-2): 3-22.
12. Radulovic N, Miltojević A, Stojković M, Blagojević P. New volatile sulfur-containing compounds from wild garlic (Allium ursinum L., Liliaceae). Food Res Int. 2015; 78: 1–10.
13. Oborny B, Botta-Dukat Z, Rufolf K, Morschhauser T. Population ecology of Allium ursinum a space-monopolizing clonal plant. Acta Botanica Hungarica. 2011; 53:371-88.
14. Krivokapić M, Bradic J, Petkovic A, Tomovic M. Phytochemical and pharmacological properties of Allium ursinum. Ser J Exp Clin Res. 2017.
15. Reuter HD, Allium sativum and Allium ursinum: Part 2 Pharmacology and Medicinal Application. Phytomedicine. 1995; 2(1):73-91.
16. Preuss HG, Clouatre D, Mohamadi A, Jarrell T, Wild garlic has a greater effect than regular garlic on blood pressure and blood chemistries of rats, International Urology and Nephrology, 2001, 32, 525-530.
17. Ivanova A, Mikhova B, Najdenski H, Tsvetkova I, Kostova I. Chemical composition and antimicrobial activity of wild garlic Allium ursinum of Bulgarian origin. Nat Prod Commun. 2009; 4(8):1059-62.
18. Borlinghaus J, Albrecht F, Gruhlke M, Nwachukwu I, Slusarenko A. Allicin: chemistry and biological properties. Molecules. 2014; 19(8):12591-618.
19. Schmitt B, Schulz H, Storsberg J, Keusgen M. Chemical characterization of Allium ursinum L. depending on harvesting time. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005; 53:7288–94.
20. Bajac J, Nikolovski B, Kocić-Tanackov S, Stupar A, Mandić A, Varga J, et al. Extraction of different garlic varieties (Allium sativum L.) – determination of organosulfur compounds and microbiological activity. 2018.
21. Zhang Y, Liu X, Ruan J, Zhuang X, Zhang X, Li Z. Phytochemicals of garlic: Promising candidates for cancer therapy. Biomed. Pharmacother. 2020; 123:109730.

22. Londhe, V; Gavasane A, Nipate S, Bandawane D, Chaudhari P. Role of garlic (*Allium sativum*) in various diseases: An overview. *J. Pharma.Res.* 2011; 1:29–134.
23. Block E, Birringer M, Jiang W, Nakahodo T, Thompson H, Toscano P, et al. Allium chemistry: synthesis, natural occurrence, biological activity, and chemistry of Se-alk(en)ylselenocysteines and their γ -glutamyl derivatives and oxidation products. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2001; 49(1):458-70
24. Chan JY, Yuen A, Chan R, Chan S. A review of the cardiovascular benefits and antioxidant properties of allicin. *Phyther. Res.* 2013; 27:637–46.
25. Bansal M, Singh N, Pal S, Dev I, Ansari K. Chemopreventive Role of Dietary Phytochemicals in Colorectal Cancer. *Advances in Molecular Toxicology.* 2018.
26. Godjevac D, Vujisić L, Mojović M, Ignjatović A, Spasojević I, Vajs V. Evaluation of antioxidant capacity of *Allium ursinum* L. volatile oil and its effect on membrane fluidity. *Food chemistry.* 2008;107(4):1692-700.
27. Mikaili P, Maadirad S, Moloudizargari M, Aghajanshakeri S, Sarahroodi S. Therapeutic uses and pharmacological properties of garlic, shallot, and their biologically active compounds. *Iran J. Basic Med. Sci.* 2013; 16:1031–48.
28. Murillo G, Mehta R. Chemoprevention of chemically-induced mammary and colon carcinogenesis by α -hydroxyvitamin D₅. *Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2005; 97:129-36.
29. Altonsy M, Andrews S. Diallyl disulphide, a beneficial component of garlic oil, causes a redistribution of cell-cycle growth phases, induces apoptosis, and enhances butyrate-induced apoptosis in colorectal adenocarcinoma cells (HT-29). *Nutr. Cancer.* 2011; 63:1104–13.
30. Tsao S, Hsu C, Yin M. Garlic extract and two diallyl sulphides inhibit methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in BALB/cA mice. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; 52:974–80.
31. Dhuley J, Naik S, Rele S, Banerji A. Hypolipidaemic and antioxidant activity of diallyl disulphide in rats. *Pharm. Pharmacol. Commun.* 1999; 5:689–96.
32. Liu C, Hse H, Lii C, Chen P, Sheen L. Effects of garlic oil and diallyl trisulfide on glycemic control in diabetic rats. *Eur. J. Pharm.* 2005; 516:165–73.
33. Malki A, El-saadani M, Sultan A. Garlic constituent diallyl trisulfide induced apoptosis in MCF7 human breast cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* 2009; 8:2175–85.
34. Kinalski T, Noreña CPZ. Effect of blanching treatments on antioxidant activity and thiosulfinate degradation of garlic (*Allium sativum* L.). *Food Bioprocess Technol.* 2014; 7(7):2152–7.
35. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity.* 2009; 2(5):270-8.
36. Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual review of nutrition.* 2002; 22(1):19-34.
37. Carotenuto A, De Feo V, Fattorusso E, Lanzotti V, Magno S, Cicala C. The flavonoids of *Allium ursinum*. *Phytochemistry.* 1996; 41(2):531-6.
38. Wu H, Dushenkov S, Ho CT, Shengmin S. Novel acetylated flavonoid glycosides from the leaves of *Allium ur-sinum*. *Food Chem.* 2009; 115:592–95.
39. Błażewicz-Woźniak M, Michowska A. The growth, flowering and chemical composition of leaves of three ecotypes of *Allium ursinum* L. *Acta Agrobot.* 2011; 64: 171–80.
40. Gîtin L, Dinică R, Parnavel R. The influence of extraction method on the apparent content of bioactive compounds in Romanian *Allium* spp. leaves. *Not Bot Horti Agrobot Cluj Napoca.* 2012; 40(1):93–7.
41. Oszmiański J, Kolniak-Ostek J, Wojdyło A. (2013). Characterization and content of flavonol derivatives of *Allium ursinum* L. plant. *J Agric Food Chem.* 61, 176-84.

42. Djurdjevic L, Dinic A, Pavlovic P et al. Allelo-pathic potential of *Allium ursinum* L. *Biochem Syst Ecol.* 2004; 32:533–44.
43. Condrat D, Mosoarca C, Zamfir AD, Crişan F, Szabo M, Lupea A. Qualitative and quantitative analysis of gallic acid in *Alchemilla vulgaris*, *Allium ursinum*, *Acorus calamus* and *Solidago virga-aurea* by chip-electrospray ionization mass spectrometry and high performance liquid chromatography. *Cent Eur J Chem.*2010; 8:530–5.
44. Sobolewska D, Janeczko Z, Kisiel W, Podolak I, Galanty A, Trojanowska D. Steroidal glycosides from the underground parts of *Allium ursinum* L. and their cytostatic and antimicrobial activity. *Acta Pol Pharm.* 2006; 63(3):219-23.
45. Smeets K, Van Damme EJ, Van Leuven F, Peumans WJ. Isolation, characterization and molecular cloning of a leaf-specific lectin from ramsons (*Allium ursinum* L.). *Plant Mol Biol.* 1997; 35(4):531-5.
46. Sabha D, Hiyasat B, Grötzing K, Hennig L, Schlegel F, Mohr FW, et al. *Allium ursinum* L.: bioassay-guided isolation and identification of a galactolipid and a phytosterol exerting antiaggregatory effects. *Pharmacology.* 2012; 89(5-6):260-9.
47. Satyal P, Craft JD, Dosoky NS, Setzer WN. The Chemical Compositions of the Volatile Oils of Garlic (*Allium sativum*) and Wild Garlic (*Allium vineale*). *Foods.* 2017; 6(8):63.
48. Copra-Janicijevic A, Muradic S, Huseinovic S, Tahirovic I, Toromanovic J, Sapcanin , et al. Isolation of essential oils of *Allium ursinum* L from Bosnia. *Planta Medica.* 2008; 74.
49. Hasler CM. Functional foods: benefits, concerns and challenges-a position paper from the american council on science and health. *J Nutr.* 2002; 132(12):3772-81.
50. Rodriguez E, Flavier M, Rodriguez-Amaya D, Amaya-Farfán J. Phytochemicals and functional foods. Current situation and prospect for developing countries. *Segurança Alimentar e Nutricional.* 2006; 13:1-22.
51. Kubiak-Martens L. New evidence for the use of root foods in pre-agrarian subsistence recovered from the late Mesolithic site at Halsskov, Denmark. *Veg Hist Archaeobot.* 2002; 11:23–31.
52. Fallahi F, Roghani M, Khalilzad M. Hypoglycemic and Hypolipidemic Effects of *Allium Ursinum* in Diabetic Rats. *JSSU.* 2011; 19 (1):65-74.
53. Melino S, Leo S, Toska Papajani V. Natural Hydrogen Sulfide Donors from *Allium* sp. as a Nutraceutical Approach in Type 2 Diabetes Prevention and Therapy. *Nutrients.* 2019; 11(7):1581.
54. Xiao-yan X, Guo-qing S, Yan-qiu Y, Hai-ying M, Ling M, Yu-nan J. Apoptosis and G₂/M arrest induced by *Allium ursinum* (ramson) watery extract in an AGS gastric cancer cell line. *Onco Targets Ther.* 2013; 6: 779–83.
55. Reddy BS, Rao CV, Rivenson A, Kelloff G. Chemoprevention of colon carcinogenesis by organosulfur compounds. *Cancer Res.* 1993; 53(15):3493-8.
56. Brady JF, Ishizaki H, Fukuto JM, Lin MC, Fadel A, Gapac JM, Yang CS. Inhibition of cytochrome P-450 2E1 by diallyl sulfide and its metabolites. *Chem Res Toxicol.* 1991; 4(6):642-7.
57. Xiao D, Zeng Y, Hahm ER, Kim YA, Ramalingam S, Singh SV. Diallyl trisulfide selectively causes Bax- and Bak-mediated apoptosis in human lung cancer cells. *Environ Mol Mutagen.* 2009; 50(3):201-12.
58. Hsing AW, Chokkalingam AP, Gao YT, Madigan MP, Deng J, Gridley G, et al. *Allium* vegetables and risk of prostate cancer: a population-based study. *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94(21):1648-51.
59. Mărăcineanu R. Studies on medicinal and aromatic plants used in the therapeutic recipes in the bucharest university hospital. *Sci. Pap. Univ. Agron. Sci. Vet. Med. Buchar. Ser. AAgron.* 2011; LIV:304–13.

60. Bombicz M, Priksz D, Varga B, Gesztelyi R, Kertesz A, Lengyel P, et al. Anti-Atherogenic Properties of *Allium ursinum* Liophylisate: Impact on Lipoprotein Homeostasis and Cardiac Biomarkers in Hypercholesterolemic Rabbits. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(8):1284.
61. Rodriguez-Porcel M, Lerman LO, Holmes DR Jr, Richardson D, Napoli C, Lerman A. Chronic antioxidant supplementation attenuates nuclear factor-kappa B activation and preserves endothelial function in hypercholesterolemic pigs. *Cardiovasc Res.* 2002; 53(4):1010-8.
62. Hiyasat B, Sabha D, Grotzinger K, Kempfert J, Rauwald JW, Mohr FW, et al. Antiplatelet activity of *Allium ursinum* and *Allium sativum*. *Pharmacology.* 2009; 83(4):197-204.
63. Mohamadi A, Jarrell ST, Shi SJ, Andrawis NS, Myers A, Clouatre D, et al. Effects of wild versus cultivated garlic on blood pressure and other parameters in hypertensive rats. *Heart Dis.* 2000; 2(1):3-9.
64. Sendl A, Elbl G, Steinke B, Redl K, Breu W, Wagner H. Comparative pharmacological investigations of *Allium ursinum* and *Allium sativum*. *Planta Med.* 1992; 58(1):1-7.
65. Rietz B, Isensee H, Strobach H, Makdessi S, Jacob R. Cardioprotective actions of wild garlic (*allium ursinum*) in ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem.* 1993; 119(1-2):143-50.
66. Bombicz M, Priksz D, Varga B, Kurucz A, Kertész A, Takacs A, et al. A Novel Therapeutic Approach in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension: *Allium ursinum* Liophylisate Alleviates Symptoms Comparably to Sildenafil. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(7):1436.
67. Mihaylova DS, Lante A, Tinello F, Krastanov AI. Study on the antioxidant and antimicrobial activities of *Allium ursinum* L. pressurised-liquid extract. *Nat Prod Res.* 2014; 28(22):2000-5.
68. Parvu M, Parvu AE, Vlase L et al. Antifungal properties of *Allium ursinum* L. ethanol extract. *J Med Plants Res.* 2011; 5:2041–204.
69. Ankri S, Mirelman D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infect.* 1999; 1:125-9.
70. Alina Parvu E, Catoi F, Deelwar S, Sarup D Pârvu M. Anti-Inflammatory Effect of *Allium ursinum*. *Notulae Scientia Biologicae.* 2014:6-10.
71. Moutia M, Habti N, Badou A. *In Vitro* and *In Vivo* Immunomodulator Activities of *Allium sativum* L. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2018; 2018:4984659.
72. Schäfer G, Kaschula CH. The immunomodulation and anti-inflammatory effects of garlic organosulfur compounds in cancer chemoprevention. *Anticancer Agents Med Chem.* 2014; 14(2):233-40.
73. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest.* 2013; 123(1):92-100.
74. Maxwell S. Emergency management of acute myocardial infarction. *Br J Clin Pharmacol.* 1999; 48(3):284-98.
75. Xu YJ, Capistrano R, Dhooche L, Foubert K, Lemièrre F, Maregesi S, et al. Herbal medicines and infectious diseases: characterization by LC-SPE-NMR of some medicinal plant extracts used against malaria. *Planta Med.* 2011; 77(11):1139-48.
76. Sagdic O, Tornuk F. Antimicrobial Properties of Organosulfur Compounds. *Dietary Phytochemicals and Microbes.* 2012; pp 127-56.
77. Liaqat A, Zahoor T, Randhawa M. Characterization and antimicrobial potential of bioactive components of sonicated extract from garlic (*Allium sativum*) against foodborne pathogens. *Journal of Food Processing and Preservation.* 2019; 43.

78. Galdiero E, Di Onofrio V, Maione A, Gambino E, Gesuele R, Menale B, et al. Allium ursinum and Allium oschaninii against Klebsiella pneumoniae and Candida albicans Mono- and Polymicrobial Biofilms in In Vitro Static and Dynamic Models. *Microorganisms*. 2020; 8(3):336.
79. Yattoo MI, Gopalakrishnan A, Saxena A, Parray OR, Tufani NA, Chakraborty S, et al. Anti-Inflammatory Drugs and Herbs with Special Emphasis on Herbal Medicines for Countering Inflammatory Diseases and Disorders - A Review. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2018; 12(1):39-58.
80. Nunes CDR, Barreto Arantes M, Menezes de Faria Pereira S, Leandro da Cruz L, de Souza Passos M, Pereira de Moraes L, et al. Plants as Sources of Anti-Inflammatory Agents. *Molecules*. 2020; 25(16):3726.
81. Zhong J, Shi G. Editorial: Regulation of Inflammation in Chronic Disease. *Front Immunol*. 2019; 10:737.
82. Virshette S, Patil M, Somkuwar A. A review on medicinal plants used as anti-inflammatory agents. *J. Pharmacogn. Phytochem*. 2019; 8:1641–6.
83. Shah B., Seth A., Maheshwari K. A Review on Medicinal Plants as a Source of Anti-inflammatory Agents. *Res. J. Med. Plant*. 2011; 5:101–15.
84. Arreola R, Quintero-Fabián S, López-Roa RI, Flores-Gutiérrez EO, Reyes-Grajeda JP, Carrera-Quintanar L, et al. Immunomodulation and anti-inflammatory effects of garlic compounds. *J Immunol Res*. 2015; 2015:401630.
85. Feng Y, Zhu X, Wang Q, Jiang Y, Shang H, Cui L, et al. Allicin enhances host pro-inflammatory immune responses and protects against acute murine malaria infection. *Malaria Journal*. 2012; 11:268.
86. Hodge G, Hodge S, Han P. Allium sativum (garlic) suppresses leukocyte inflammatory cytokine production in vitro: potential therapeutic use in the treatment of inflammatory bowel disease. *Cytometry*. 2002; 48(4):209-15.
87. Kurutas, E. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr. J*. 2015; 15: 71.
88. Sharma P, Jha A, Dubey R, Pessarakli M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot*. 2012; 2012:26.
89. Jha N, Ryu JJ, Choi EH, Kaushik NK. Generation and Role of Reactive Oxygen and Nitrogen Species Induced by Plasma, Lasers, Chemical Agents, and Other Systems in Dentistry. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 2017:7542540.
90. Ginter E, Simko V. Plant polyphenols in prevention of heart disease. *Bratisl Lek Listy*. 2012; 113(8):476-80.
91. Sharifi-Rad M, Anil Kumar NV, Zucca P, Varoni EM, Dini L, Panzarini E, et al. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Front Physiol*. 2020; 11:694.
92. Zucca P, Argiolas A, Nieddu M, Pintus M, Rosa A, Sanna F, et al. Biological activities and nutraceutical potentials of water extracts from different parts of *Cynomorium coccineum* L. (Maltese Mushroom). *Polish J. Food Nutr. Sci*. 2016; 66:179–88.
93. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2010; 2(12):1231-46.
94. 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.
95. 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.

96. 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.
97. Bradic J, Zivkovic V, Srejovic I, Jakovljevic V, Petkovic A, Turnic TN, Jeremic J, Jeremic N, Mitrovic S, Sobot T, Ponorac N, Ravic M, Tomovic M. Protective Effects of *Galium verum* L. Extract against Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury in Spontaneously Hypertensive Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2019; 2019:4235405.
98. Beutler E. Catalase. In: Beutler E., editor. *Red Cell Metabolism, a Manual of Biochemical Methods*. New York, NY, USA: Grune and Stratton; 1982. pp. 105–106.
99. Beutler E. Superoxide dismutase. In: Beutler E., editor. *Red Cell Metabolism, a Manual of Biochemical Methods*. Philadelphia, PA, USA: Grune and Stratton; 1984. pp. 83–85.
100. Beutler E. Reduced glutathione (GSH) In: Beutler E., editor. *Red Cell Metabolism, a Manual of Biochemical Methods*. New York, NY, USA: Grune and Stratton; 1975. pp. 112–114.
101. 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.
102. Nawaz H, Shad, Rehman N, Andaleeb H, Ullah N. Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020; 56.
103. Locatelli D, Altamirano J, González R, Camargo A. Home-cooked garlic remains a healthy food. *Journal of Functional Foods*. 2015; 16:1-8.
104. Locatelli DA, Nazareno MA, Fusari CM, Camargo AB. Cooked garlic and antioxidant activity: Correlation with organosulfur compound composition. *Food Chem*. 2017; 220:219-24.
105. Tocmo R, Wu Y, Dong L, Fogliano V, Huang D. Boiling enriches the linear polysulfides and the hydrogen sulfide-releasing activity of garlic. *Food Chemistry*. 2017; 221:1867-73.
106. Brasileiro B, Leite JP, Casali V, Pizziolo V, Coelho O. The influence of planting and harvesting times on the total phenolic content and antioxidant activity of *Talinum triangulare* (Jacq.) Willd. *Acta Scientiarum. Agronomy*. 2015; 37(2):249-55.
107. Krivokapic M, Jakovljevic V, Sovrlić M, Bradic J, Petkovic A, Radojevic I, Brankovic S, Čomić Lj, Andjic M, Kočović A, Tomovic M. Biological activities of different extracts from *Allium ursinum* leaves. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. 2020; 77: 121-9.
108. Lesjak, M, Beara, I, Orčić D, Knežević P, Simin N, Svirčev E, Mimica-Dukić N. Phytochemical composition and antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities of *Juniperus macrocarpa* Sibth. et Sm. *Journal of Functional Foods*. 2014; 7: 257–68.
109. Nikkhahi M, Souri E, Sarkhail P, Baeri M, Mohammadhosseini N. Evaluation of anti-tyrosinase activity of *Allium Ursinum* extracts and their metal complexes. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment*. 2018;17(3):219–26.
110. Mihaylova D, Sapunjieva T, Alexieva I, Popova A. Antimicrobial and antioxidant activity of extracts of *Allium ursinum* L.. *Journal of BioScience and Biotechnology*. 2012; 143-45.
111. Rossiter SE, Fletcher MH, Wuest WM. Natural Products as Platforms To Overcome Antibiotic Resistance. *Chem Rev*. 2017; 117(19):12415-74.
112. Khameneh B, Iransahy M, Soheili V, Fazly Bazzaz BS. Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019; 8:118.

113. Mihaylova D, Lanteb A, Tinello F, Krastanova A. Study on the antioxidant and antimicrobial activities of *Allium ursinum* L. pressurised-liquid extract. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*. 2014; 28(22):2000–5.
114. Pavlović DR, Veljković M, Stojanović NM, Gočmanac-Ignjatović M, Mihailov-Krstev T, Branković S, et al. Influence of different wild-garlic (*Allium ursinum*) extracts on the gastrointestinal system: spasmolytic, antimicrobial and antioxidant properties. *J Pharm Pharmacol*. 2017; 69(9):1208-18.
115. Bagiu RV, Vlaicu B, Butnariu M. Chemical composition and in vitro antifungal activity screening of the *Allium ursinum* L. (Liliaceae). *Int J Mol Sci*. 2012; 13(2):1426-36.
116. Ambatipudi NVK, Pardha. S. Cumulative activity of the p-coumaric acid and syringaldehyde for antimicrobial activity of different microbial strains. *European Journal of Experimental Biology*. 2014. 40-3.
117. Valdramidis V, Geeraerd A, Tiwari B, Cullen B, Kondjoyan A, Van Impe J. Estimating the efficacy of mild heating processes taking into account microbial non-linearities: a case study on the thermisation of a food simulant. *Food Control*. 2011;22:137–42.
118. Shi C, Zhang X, Sun Y, Yang M, Song K, Zheng Z, et al. Antimicrobial Activity of Ferulic Acid Against *Cronobacter sakazakii* and Possible Mechanism of Action. *Foodborne Pathog Dis*. 2016; 13(4):196-204.
119. Tatsimo S, Tamokou J.deD, L. Havyarimana, D. Csupor, P. Forgo, J. Hohmann, J.-R. Kuate, P. Tane. Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. *BMC Res Notes*. 2012; 5:158.
120. Synowiec A, Gniewosz M, Zieja J, Bączek K, Przybył J. The comparison of antimicrobial properties of ramson (*Allium ursinum*) extracts. *Zeszyty problemowe postępow nauk rolniczych*. 2010; 553:203-9.
121. Bloom D, Cafiero E, Jané-Llopis E, et al. The Global Economic Burden of Noncommunicable Diseases. Geneva, Switzerland: World Economic Forum. 2011.
122. Golia E, Limongelli G, Natale F, Fimiani F, Maddaloni V, Pariggiano I. Inflammation and cardiovascular disease: from pathogenesis to therapeutic target. *Curr Atheroscler Rep*. 2014; 16(9):435.
123. Dutta S, Das S. A study of the anti-inflammatory effect of the leaves of *Psidium guajava* Linn. on experimental animal models. *Pharmacognosy Res*. 2010; 2(5):313-7
124. Carullo G, Cappello AR, Frattaruolo L, Badolato M, Armentano B, Aiello F. Quercetin and derivatives: useful tools in inflammation and pain management. *Future Med Chem*. 2017; 9(1):79-93.
125. Yaman Z, Yuping L, Jiazhen Y, Xiaoying P, Juan D, Xiaomeng Z, et al. Therapeutic Role of Functional Components in Alliums for Preventive Chronic Disease in Human Being. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2017; 2017:1-13.
126. Zhu H, Liang QH, Xiong XG, Wang Y, Zhang ZH, Sun MJ, et al. Anti-Inflammatory Effects of p-Coumaric Acid, a Natural Compound of *Oldenlandia diffusa*, on Arthritis Model Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2018; 2018:5198594.
127. Lovegrove JA, Stainer A, Hobbs DA. Role of flavonoids and nitrates in cardiovascular health. *Proc Nutr Soc*. 2017; 19:1-13.
128. Khan H, Ullah H, Martorell M, Valdes SE, Belwal T, Tejada S, et al. Flavonoids nanoparticles in cancer: Treatment, prevention and clinical prospects. *Semin Cancer Biol*. 2019; S1044-579X(19)30182-8.
129. Gitin L, Dinica RM, Parnavel R. The influence of extraction method on the apparent content of bioactive compounds in Romanian *Allium* spp. leaves. *Not Bot Horti Agrobot Cluj Napoca* 2012; 40:93–97.

130. Stajner D, Popović BM, Canadanović-Brunet J, Stajner M. Antioxidant and scavenger activities of *Allium ursinum*. *Fitoterapia*. 2008; 79(4):303-5.
131. El-Demerdash FM, Yousef MI, El-Naga NI. Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol*. 2005; 43(1):57–63.
132. Masjedi F, Gol A, Dabiri S. Preventive Effect of Garlic (*Allium sativum* L.) on Serum Biochemical Factors and Histopathology of Pancreas and Liver in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Ira J Pharm Res*. 2003; 12(3):325–38.
133. Navari-Izzo F, Meneguzzo S, Longgini B, Vazzona C, Sgherri CLM. *Physiol Plant* 1997; 99:23.
134. Huda-Faujan N, Noriham A, Norrakiah A, Babji A. Antioxidant activity of plants methanolic extracts containing phenolic compounds. *African Journal of Biotechnology*. 2009; 8(3): 484–9.
135. Sandhar H, Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M, Sharma P. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutical Scientia*. 2011; 1:25–41.
136. Carocho M, Ferreira I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; 51:15–25.
137. Rodrigo R, Passalacqua W, Araya J, Orellana M, Rivera G. Implications of oxidative stress and homocysteine in the pathophysiology of essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2003; 42:453–61.
138. Lassègue B, Griendling K. Reactive oxygen species in hypertension, an update. *AJH* 2004; 17:852–60.
139. Rodrigo R, González J, Paoletto F. The role of oxidative stress in the pathophysiology of hypertension. *Hypertens Res*. 2011; 34(4):431-40.
140. Lizcano LJ, Vilorio-Bernal M, Vicente F, Berrueta LA, Gallo B, Martínez-Cañamero M, et al. Lipid oxidation inhibitory effects and phenolic composition of aqueous extracts from medicinal plants of Colombian Amazonia. *Int J Mol Sci*. 2012; 13(5):5454-67.
141. Michel JB, Feron O, Sase K, Prabhakar P, Michel T. Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 1997; 272:25907–12.
142. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Scientific World Journal*. 2013; 2013:162750.
143. Wang CZ, Mehendale SR, Yuan CS. Commonly used antioxidant botanicals: active constituents and their potential role in cardiovascular illness. *Am J Chin Med*. 2007; 35(04):543–558.
144. Zern TL, Fernandez ML. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *J Nutr*. 2005; 135(10):2291–94.
145. Shah SMA, Akram M, Riaz M, Munir N, Rasool G. Cardioprotective Potential of Plant-Derived Molecules: A Scientific and Medicinal Approach. *Dose Response*. 2019; 17(2):1559325819852243.
146. Asgary S, Rastqar A, Keshvari M. Functional Food and Cardiovascular Disease Prevention and Treatment: A Review. *J Am Coll Nutr*. 2018; 37(5):429-55.
147. Kalogeris T, Baines C, Krenz M, Korthuis R. Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2012; 298:229-317
148. Bombicz M, Priksz D, Varga B, Gesztelyi R, Kertesz A, Lengyel P, et al. Anti-Atherogenic Properties of *Allium ursinum* Liophylisate: Impact on Lipoprotein Homeostasis and Cardiac Biomarkers in Hypercholesterolemic Rabbits. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(8):1284.

149. 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.
150. Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Inerte J, Rodriguez-Sinovas A, Piper HM. Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2012; 94(2): 168-80.
151. 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.
152. Tangney CC, Rasmussen HE. Polyphenols, inflammation, and cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep.* 2013; 15(5):324.
153. Pedrinelli R, Ballo P, Fiorentini C, Denti S, Galderisi M, Ganau A, et al. Hypertension and acute myocardial infarction: an overview. *J Cardiovasc Med (Hagerstown).* 2012; 13(3):194-202.
154. Frohlich E. Fibrosis and ischemia: the real risks in hypertensive heart disease, *American Journal of Hypertension.* 2001; 14(3):194S–199S.
155. Kishimoto Y, Tani M, Kondo K. Pleiotropic preventive effects of dietary polyphenols in cardiovascular diseases. *Eur J Clin Nutr.* 2013; 67(5):532-5.
156. Marczin N, El-Habashi N, Hoare GS, Bundy RE, Yacoub M. Antioxidants in myocardial ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential and basic mechanisms. *Arch Biochem Biophys.* 2003; 420(2):222-36.
157. Vries DK, Kortekaas KA, Tsikas D, Wijermars LGM, van Noorden CJF, Suchy MT, et al. Oxidative Damage in Clinical Ischemia/Reperfusion Injury: A Reappraisal. *Antioxid Redox Signal.* 2013; 19(6):535–45.
158. Gourdin MJ, Bree B, De Kock M. The impact of ischaemia-reperfusion on the blood vessel. *Eur J Anaesthesiol.* 2009; 26(7):537-47.
159. Fuller W, Parmar V, Eaton P, Bell J, Shattock M. Cardiac ischemia causes inhibition of the Na/K ATPase by a labile cytosolic compound whose production is linked to oxidant stress. *Cardiovasc Res.* 2003; 57(4):1044-51.
160. Zalba G, Beaumont FJ, San José G, Fortuño A, Fortuño MA, Etayo JC, Díez J. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2000; 35(5):1055-61.
161. Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T, Harrison DG. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation.* 2001; 103(9):1282-8.
162. Mennuni S, Rubattu S, Pierelli G, Tocci G, Fofi C, Volpe M. Hypertension and kidneys: unraveling complex molecular mechanisms underlying hypertensive renal damage. *J Hum Hypertens.* 2014; 28(2):74-9.
163. Antonaccio, M, Rubin B, Horovitz Z. Effects of captopril in animal models of hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.* 1980; 2:613–37.
164. Miquel R, Gisbert R, Serna E, Perez-Vizcaino F, Anselmi E, Noguera M, et al. Acute and chronic captopril, but not prazosin or nifedipine, normalize alterations in adrenergic intracellular Ca²⁺ handling observed in the mesenteric arterial tree of spontaneously hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005; 313:359–67.
165. Paredes MD, Romecín P, Atucha NM, O'Valle F, Castillo J, Ortiz MC, et al. Moderate Effect of Flavonoids on Vascular and Renal Function in Spontaneously Hypertensive Rats. *Nutrients.* 2018; 10(8):1107.

166. Marushchak A, Rogovyy Y, Shvets V, Doroshko V, Savchuk T. Morphological changes in tissues of organs in rats with arterial hypertension (SHR) with treatment of hypotensive medicines (with ramipril and candesartan) in combination with corvitin. 2020; 1(23):
167. Bishayee A, Darvesh AS, Politis T, McGory R. Resveratrol and liver disease: From bench to bedside and community. *Liver Int.* 2010; 30:1103–14.
168. Li S, Tan HY, Wang N, Cheung F, Hong M, Feng Y. The Potential and Action Mechanism of Polyphenols in the Treatment of Liver Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2018; 2018:8394818.
169. Ojha N, Roy S, Radtke J, Simonetti O, Gnyawali S, Zweier JL, et al. Characterization of the structural and functional changes in the myocardium following focal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 294(6):H2435-43.

Биографија

Милош Кривокапић рођен је 22.09.1991. године, у Подгорици, Црна Гора. Завршио је гимназију „Слободан Шкеровић” у Подгорици. Фармацеутски факултет Универзитета у Београду уписао је 2010. године, а 25.09.2015. године одбранио мастер рад на тему „Процена адхеренце код пацијената са хипертензијом” на катедри Клиничка фармација. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу уписао је 2015. године, смер Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином и положио усмени докторски испит и стекао услов за пријаву докторске дисертације. Ради као сарадник у настави Медицинског факултета Универзитета Црне Горе.

Списак објављених радова (прописани минимални услов за одбрану докторске дисертације)

1. **Krivokapic MZ**, Jakovljevic VLj, Sovrlic MM, **Bradic JV**, Petkovic AM, Radojevic ID, Brankovic SR, Comic LJR, Andjic MM, Kocovic AG, Tomovic MT. Biological activities of different extracts from *Allium ursinum* leaves. *Acta Poloniae Pharmaceutica- Drug research*. 2020; 77(1):121-129 **M23**
2. Smigic J, Sabo T, Vranic A, Zivkovic V, Srejovic I, Turnic TN, Milosavljevic I, Poljarevic J, **Krivokapic M**, Bolevich S, Jakovljevic VL. Chronic effects of platinum(IV) complex and its diamine ligand on rat heart function: comparison with cisplatin. *Mol Cell Biochem*. 2019; 458(1-2):89-98. **M23**
3. **Krivokapic M**, Bradic J, Petkovic A, Tomovic M. Phytochemical and pharmacological properties *Allium Ursinum*. *Ser J Exp Clin Res*. 2018; doi: 10.2478/sjecr-2018-0003. **M51**

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Милош Кривокапић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Испитивање антимикробних, антиинфламацијских, антиоксидационих и кардиопротективних ефеката екстракта сремуса, Allium ursinum L

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу _____, 19.3.2021. године,


потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Милош Кривокапић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Испитивање антимикробних, антиинфламацијских, антиоксидационих и
кардиопротективних ефеката екстракта сремуша, *Allium ursinum* L

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

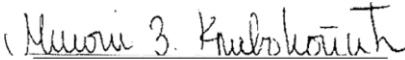
не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу _____, 19.3.2021. године,


потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org/rs/>