

Univerzitet u Beogradu
Farmaceutski fakultet



Gordana M. Miljak Vujičić

ZAVRŠNI RAD

Specijalističke akademske studije
Modul Biohemijska dijagnostika

In vitro ispitivanje antioksidativne aktivnosti preparata
ruzmarinske kiseline i meda

Beograd, 2020.

Završni rad je urađen na Katedri za medicinsku biohemiju
Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Mentor:

Prof. dr Vesna Spasojević-Kalimanovska,
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Članovi komisije:

1. _____

Prof. dr Jelena Kotur-Stevuljević, redovni
profesor, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

2. _____

Prof. dr Brižita Đorđević, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Ocena završnog rada _____

Datum odbrane završnog rada _____

***In vitro* ispitivanje antioksidativne aktivnosti preparata ruzmarinske kiseline i meda**

Sažetak

Uvod: Usled narušavanja ravnoteže između slobodnih radikala i antioksidanasa, dolazi do oksidativnog stresa, patofiziološkog stanja, koje je povezano sa nastankom i razvojem mnogih oboljenja. Kako su se određeni sintetski antioksidansi pokazali kao potencijalno štetni po zdravlje ljudi, sve se više pažnje usmerava ka pronalaženju prirodnih antioksidanasa. Polifenoli, fenolne kiseline, u koje spada i ruzmarinska kiselina, terpeni i terpenoidi su sekundarni metaboliti biljaka koji poseduju antioksidativne osobine, a mogu se naći u različitim biljnim kompleksima (hidrolatima) i medu. **Cilj:** Cilj ovog rada je utvrđivanje *in vitro* antioksidativne aktivnosti preparata koji predstavlja mešavinu biljnih kompleksa (hidrolata), ruzmarinske kiseline i meda. **Materijal i metode:** U „pool“ seruma, koji je dobijen mešanjem seruma zdravih pojedinaca, dodavana su serijska razblaženja (100%, 50%, 25%) ispitivanog preparata, kao i serijska razblaženja ispitivanog preparata (100%, 50%, 25%) u prisustvu terc-butil hidroperokisda (TBH), kao prooksidansa. Pored ovih uzoraka, pripremljeni su i uzorci u koje je dodavan troloks (hidrofilni analog vitamina E), kao i troloks u prisustvu TBH. Iz svih uzoraka vršeno je određivanje parametara antioksidativnog stresa: totalnog antioksidativnog statusa (TAS), paraoksonaze-1 (PON1), ukupnog sadržaja sulfhidrilnih grupa (SHG), totalnog oksidativnog statusa (TOS), prooksidativnog-antioksidativnog balansa (PAB) i uznapredovalih produkata oksidacije proteina (AOPP). Takođe, izračunat je i odnos TAS/TOS koji predstavlja kvantitativnu meru odnosa antioksidativnih redukujućih supstanci i oksidujućih supstanci u serumu. **Rezultati:** Kako bi se utvrdila statistički značajna razlika ($p \leq 0,05$) između dobijenih rezultata za ispitivane parametre, korišćen je Mann-Whitney U test. Ispitivani preparat je pokazao značajno više koncentracije antioksidativnih parametara TAS, SHG i PON1 ($p \leq 0,05$), kao višu vrednost TAS/TOS odnosa ($p \leq 0,05$) i značajno nižu koncentraciju parametara oksidacije PAB i AOPP ($p \leq 0,05$), dok za TOS nije bilo značajne razlike u odnosu na uzorke seruma i uzorke sa troloksom. Pri dodatku TBH ispitivani preparat je takođe pokazao više koncentracije TAS i SHG ($p \leq 0,05$), kao i vrednost TAS/TOS ($p \leq 0,05$) odnosa i pad koncentracije PAB ($p \leq 0,05$) u odnosu na uzorke seruma i troloksa sa dodatkom TBH. Poređenjem vrednosti antioksidativnih parametara TAS, SHG, TAS/TOS odnosa i parametara ravnoteže prooksidanasa i antioksidanasa PAB za uzorke preparata bez i sa dodatkom TBH, nije uočena značajna razlika, što ukazuje da je i pored dodatka TBH ispitivani preparat održavao svoje antioksidativno delovanje. **Zaključak:** Ispitivani preparat pokazao je značajno antioksidativno delovanje, što se može pripisati sinergističkom delovanju terpena i terpenoida iz hidrolata, ruzmarinske kiseline, polifenola i ostalih antioksidativnih supstanci iz meda.

Ključne reči: oksidativni stres, antioksidans, hidrolati, terpeni, polifenoli, ruzmarinska kiselina, med

***In vitro* antioxidant activity evaluation of rosmarinic acid and honey based supplement**

Abstract

Introduction: Disrupting the balance between free radicals and antioxidants leads to a state called oxidative stress, a pathophysiological state, which can be the precursor to many diseases. Since some of the synthetic antioxidants showed some potentially adverse effects, there are more studies aiming to find natural antioxidants. Secondary plant metabolites, such as polyphenols, phenolic acids, which include rosmarinic acid, terpenes and terpenoids have antioxidative properties and can be found in different hydrosols and honey. **The aim:** The aim of this study is to evaluate the *in vitro* antioxidative activity of the supplement based on hydrosol mixture, rosmarinic acid and honey. **Material and methods:** A series of diluted (100%, 50%, and 25%) supplements was added to the serum pool, collected from healthy donors. A second series of samples was prepared with the same supplement amounts and tert-Butyl hydroperoxide (TBH) added as a prooxidant. Alongside these samples, sera samples with Trolox (hydrophilic vitamin E analog) and Trolox with TBH were prepared. All these samples were tested for the following oxidative stress parameters: total antioxidative status (TAS), paraoxonase-1 (PON-1), total sulfhydryl groups content (SHG), total oxidative status (TOS), prooxidative-antioxidative balance (PAB) and advanced oxidation protein products (AOPP). TAS/TOS ratio was calculated as a quantitative measurement of antioxidative and oxidative substances ratio in the serum. **Results:** Mann-Whitney U test was used to calculate p-values between sample groups for each of the parameters. The supplement showed higher TAS, SHG and PON1 antioxidative parameters (with $p < 0.05$), higher TAS/TOS ratio ($p < 0.05$), as well as significantly lower concentration of the oxidative parameters PAB and AOPP ($p < 0.05$), while there was no significant difference in TOS parameters for the serum and trolox. When TBH was added, the supplement also showed higher concentrations of TAS and SHG ($p < 0.05$), as well as TAS/TOS ($p < 0.05$), while PAB concentration was lower ($p < 0.05$), compared to the serum and trolox samples, both with TBH added. Comparing antioxidative parameters TAS, SHG, TAS/TOS ratio and prooxidant/antioxidant balance parameter PAB, for the supplement samples with and without added TBH, there was no significant difference, which indicates that the supplement keeps its antioxidative properties, despite the added TBH. **Conclusion:** The supplement showed significant antioxidative properties as a result of the synergistic effect of rosmarinic acid, terpenes, and terpenoids from hydrosols and polyphenols and other antioxidant substances from honey.

Keywords: oxidative stress, antioxidants, hydrosol, terpenes, polyphenols, rosmarinic acid, honey

SADRŽAJ

1. UVOD	5
2. OPŠTI DEO	6
2.1. OKSIDATIVNI STRES	6
2.2. SLOBODNI RADIKALI	6
2.3. LIPIDNA PEROKSIDACIJA	8
2.4. ANTIOKSIDANSI.....	9
2.5. POLIFENOLI	10
2.6. TERPENI	12
2.7. HIDROLATI	14
2.8. RUZMARINSKA KISELINA.....	15
2.9. MED	17
3. EKSPERIMENTALNI DEO	19
3.1. CILJ RADA	19
3.2. MATERIJAL I METODE.....	19
3.3. REZULTATI.....	22
3.4. DISKUSIJA	29
3.5. ZAKLJUČAK.....	31
4. LITERATURA:	32
5. PRILOZI:	37

1. Uvod

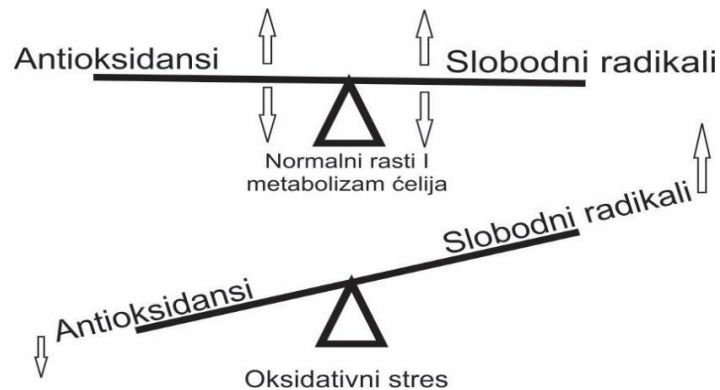
Slobodni radikali predstavljaju atome, jone ili molekule koji u svojoj strukturi poseduju jedan ili više nesparenih elektrona u spoljašnjoj orbitali, zbog čega ispoljavaju veliku reaktivnost ka drugim molekulima. Do njihovog nastajanja dolazi cepanjem kovalentnih veza, kao i u procesima oksidoredukcije. U organizmu, slobodni radikali nastaju u različitim endogenim procesima, patofiziološkim stanjima, kao i usled izlaganja različitim fizikohemijskim faktorima sredine (UV zračenje, jonizujuće zračenje, itd.). Kako bi se u organizmu odvijali normalni fiziološki procesi, neophodno je da postoji ravnoteža između slobodnih radikala i antioksidanasa, čija je funkcija da neutrališu negativno delovanje slobodnih radikala na druge molekule. Svako narušavanje ove ravnoteže vodi u patofiziološko stanje koje nazivamo oksidativni stres. Kako slobodni radikali dovode do oštećenja lipida, proteina, kao i molekula DNK, jasno je da se oksidativni stres nalazi u osnovi mnogih oboljenja. Iz ovih razloga, dodatno unošenje antioksidanasa u organizam, može pomoći u održavanju već pomenute ravnoteže. Kako su se određeni sintetski antioksidansi pokazali kao potencijalno štetni po zdravlje ljudi, sve se više pažnje usmerava ka pronalaženju prirodnih antioksidanasa, koji bi trebalo da imaju manje štetnih efekata, a da poseduju veću efikasnost.[1]–[4]

Biljke iz porodice Usnatica (Lamiaceae) bogate su sekundarnim metabolitima, među kojima se izdvajaju brojni antioksidansi, kao što su askorbinska kiselina, tokoferoli, karotenoidi, terpeni, a među njima se posebno mogu izdvojiti polifenoli. Polifenoli čine grupu jedinjenja, čija antioksidativna aktivnost zavisi od njihove strukture i prirode supstituenata na aromatičnim prstenovima, a svojom antioksidativnom aktivnošću posebno se ističu flavonoidi, tanini i fenolne kiseline, među koje spada i ruzmarinska kiselina.[5] Osim u biljkama, polifenolna jedinjenja su zastupljena i u medu, što medu, pored primarne antibakterijske aktivnosti, daje i značajnu antioksidativnu aktivnost. [6]

2. Opšti deo

2.1. Oksidativni stres

Oksidativni stres predstavlja patofiziološko stanje u kome dolazi do narušavanja ravnoteže između slobodnih radikala i antioksidanasa. Do poremećaja ravnoteže najčešće dolazi usled pojačane prooksidativne aktivnosti slobodnih radikala, ili usled smanjene antioksidativne aktivnosti (slika 1).



Slika 1. Ravnotežni odnos slobodnih radikala i antioksidanasa

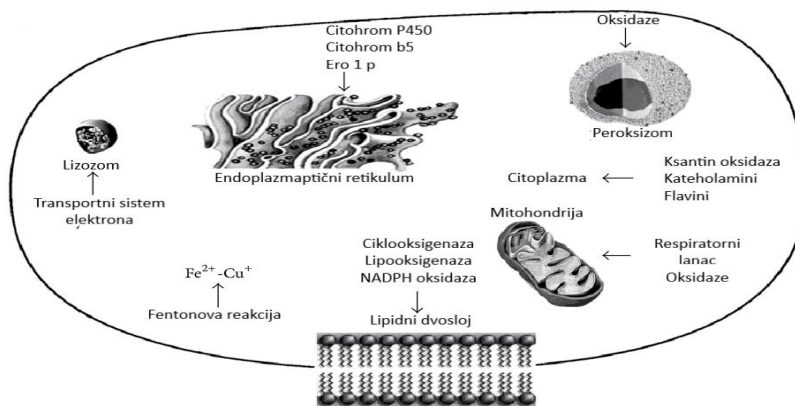
Kao posledica nastanka oksidativnog stresa dolazi do oštećenja, za organizam bitnih makromolekula, kao što su lipidi, proteini, ugljeni hidrati i DNK. Oštećenjem ovih makromolekula dolazi do oštećenja ćelija i može doći do ćelijske smrti nekrozom ili apoptozom. Iz ovih razloga, smatra se da se oksidativni stres nalazi u osnovi mnogih bolesti. Oksidativni stres je u vezi sa prirodnim procesom starenja, kao i bolestima povezanim sa starenjem, kao što su neurodegenerativne bolesti, oftalmološka oboljenja i ateroskleroza. Pored ovih oboljenja, oksidativni stres se povezuje i sa nastankom karcinoma, astme, dermatitisa, dijabetesa, bolesti jetre, bubrega, reumatoidnog artritisa, Alzhajmerove i Parkinsonove bolesti i drugih neurodegenerativnih bolesti. [7], [8]

2.2. Slobodni radikali

Slobodni radikali u organizmu nastaju u normalnim metaboličkim procesima i imaju fiziološku ulogu u procesima stvaranja energije, prenošenja signala, regulaciji ćelijskog ciklusa, regulaciji vaskularizacije tkiva, kao i u procesima odbrane organizma od različitih infekcija (antimikrobnog delovanja fagocita, stvaranja prostaglandina, leukotriena). [7], [8] Međutim, kada dođe do povećanog stvaranja slobodnih radikala njihova uloga u organizmu postaje patofiziološka. Produkcija slobodnih radikala može biti indukovana enzimskim reakcijama (reakcije respiratornog lanca, fagocitoza, sinteza prostaglandina, enzimi citohroma P450) i neenzimskim procesima. Neenzimskim procesima slobodni radikali, uglavnom nastaju pod uticajem faktora spoljašnje sredine, ali i u procesu oksidativne fosforilacije u mitohondrijama. Najčešći faktori spoljašnje sredine koji dovode do povećane produkcije slobodnih radikala su zagađenje vode i vazduha, duvanski dim, teški metali, radijacija, određeni lekovi, kao i hrana pripremljena na određeni način. Osim normalnih metaboličkih procesa, i drugi endogeni procesi mogu dovesti do

stvaranja slobodnih radikala. Starenje, stres, intenzivno vežbanje, aktivacija imunološkog sistema, infekcije, ishemija, karcinomi i mnoga druga stanja dovode do povećane produkcije slobodnih radikala. [8], [9]

U toku procesa stvaranja energije, neophodne za život ćelije, u mitohondrijama, tokom nastanka adenzin trifosfata (ATP-a) iz kiseonika, dolazi do nastanka reaktivnih vrsta kiseonika (engl. *reactive oxygen species* – ROS), kao i reaktivnih azotnih vrsta (engl. *reactive nitrogen species* – RNS). Osim u respiratornom lancu u mitohondrijama, ROS i RNS mogu nastati i u drugim procesima u citozolu, lizozomima, peroksizomima, endoplazmatičnom retikulumu i plazma membrani (slika 2). [10]



Slika 2. Endogena produkcija ROS i RNS [10]

ROS i RNS, osim što se nalaze u formi slobodnih radikala, mogu se naći i u neradikalnoj formi, tj. ne moraju imati nespareni elektron u spoljašnjoj orbitali. Iako određena jedinjenja ne poseduju nespareni elektron, ona pokazuju veliku reaktivnost i lako dovode do reakcija u kojima dolazi do daljeg stvaranja slobodnih radikala i na taj način ispoljavaju svoje prooksidativno delovanje. Glavni predstavnici ROS i RNS dati su u tabeli 1. [9], [11]

Tabela 1. Radikalni i neradikalni predstavnici ROS i RNS

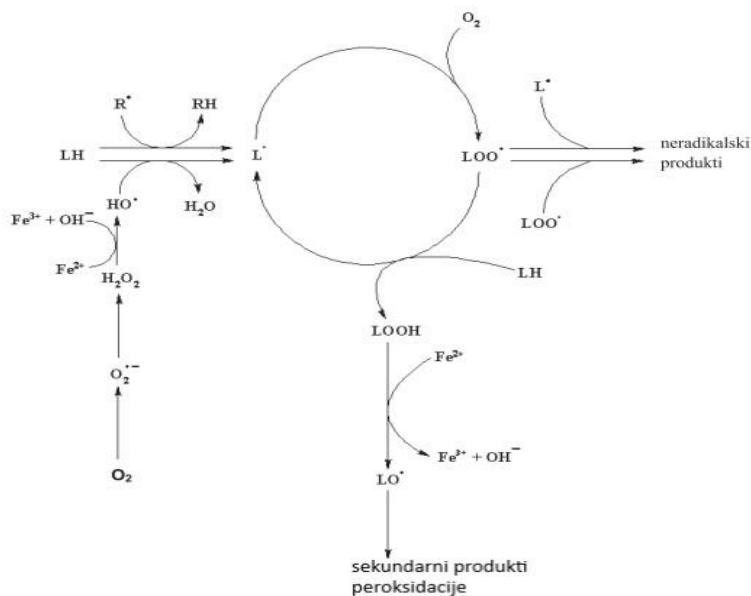
Slobodni radikali	$\cdot\text{O}_2^-$ - superoksidni anjon $\text{OH}\cdot$ - hidroksil radikal $\text{RO}\cdot$ - alkoksil radikal $\text{ROO}\cdot$ - peroksil radikal $\text{HOO}\cdot$ - hidroperoksil radikal $\text{NO}\cdot$ - azot-oksidi radikal $\text{NO}_2\cdot$ - azot-dioksidi radikal
Neradikali	H_2O_2 - vodonik-peroksid O_3 - ozon $^1\text{O}_2$ - singlet kiseonik HOCl - hipohlorasta kiselina ONOO^- - peroksinitrit RNHCl - N-hloramin

Svojim delovanjem na molekulska strukturu ćelija, slobodni radikali dovode do lipidne peroksidacije, oštećenja proteina i oštećenja DNK, čime se narušava normalno funkcionisanje ćelije.

2.3. Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija predstavlja proces u kome slobodni radikali i drugi oksidansi, posebno ROS i određeni enzimi (lipooksigenaza, ciklooksigenaza, enzimi citohroma P450) deluju na dvostruke veze između C atoma prisutne u lipidima, zbog čega su polinezasićene masne kiseline najpodložnije ovom procesu. Pored polinezasićenih masnih kiselina, lipidnoj peroksidaciji podložni su i glikolipidi, fosfolipidi i holesterol. Prilikom oštećenja membrane lipidnom peroksidacijom, ćelija najpre pokreće procese kako bi dovela do aktivacije antioksidativnog sistema zaštite, a ukoliko stepen lipidne peroksidacije prevaziđe kapacitete antioksidativnog sistema, dolazi do smrti ćelije apoptozom ili nekrozom. [12]

Proces lipidne peroksidacije se odvija u tri faze: faza inicijacije, faza propagacije i faza terminacije. Fazu inicijacije započinje oksidans, kao što je hidrosil radikal (ima najveći oksidacioni potencijal), koji je u mogućnosti da oduzme atom vodonika sa C-atoma koji je u α -položaju u odnosu na dvostruku vezu. [2] Ovim dolazi do stvaranja lipidnog radikala (L^{\bullet}), koji dalje u fazi propagacije reaguje sa kiseonikom i dovodi do stvaranja lipidnog peroksil radikala (LOO^{\bullet}). Lipidni peroksil radikal (LOO^{\bullet}) ima sposobnost da oduzme atom vodonika sa drugog lipidnog molekula i time stvori novi L^{\bullet} (koji nastavlja lančanu reakciju) i lipidni hidroperoksid ($LOOH$). U terminalnoj fazi, antioksidansi, poput vitamina E, doniraju atom vodonika LOO^{\bullet} , čime dolazi do formiranja neradikalnog proizvoda $LOOH$. Radikalni oblik vitamina E, koji nastaje doniranjem vodonika, reaguje sa drugim LOO^{\bullet} čime se prekida dalje stvaranje slobodnih radikala i prekida reakcija lipidne peroksidacije. Kada se proces lipidne peroksidacije jednom pokrene, faza propagacije traje sve dok ne dođe do formiranja terminalnih proizvoda (slika 3). [12]



Slika 3. Lipidna peroksidacija [13]

U toku procesa lipidne peroksidacije, pod uticajem gvožđa ili bakra, nastaju primarni i sekundarni produkti u koje spadaju aldehidi, ketoni, ugljovodonici, epoksidi, itd. Jedan od produkata lipidne peroksidacije je i malon-dialdehid (MDA), koji se koristi i kao marker lipidne peroksidacije. Od svih sekundarnih produkata koji nastaju, MDA je pokazao najveće mutageno delovanje. MDA ima afinitet delovanja prema ostatku lizina, kao i prema gvaninu, odakle i potiče njegovo mutageno delovanje. Drugi, značajni, sekundarni proizvod lipidne peroksidacije je 4-hidroksinonenal (4-HNE), koji u visokim koncentracijama pokazuje izuzetno toksično delovanje. 4-HNE pokazuje afinitet delovanja prema amino-grupama u DNK bazama, lizinskim ostacima lipoproteina, fosfolipidima (posebno fosfatidil-serinu i fosfatidil-etanolaminu), kao i prema -SH grupama albumina, što vodi ka inhibiciji rasta ćelije, modifikaciji lipoproteina i aterosklerozi. Još jedna grupa sekundarnih produkata lipidne peroksidacije koja nastaje peroksidacijom fosfolipida i predstavlja izomere prostaglandina su izoprostani, koji se zbog strukturne sličnosti sa prostaglandinom F2 (PGF2) nazivaju i F2-izoprostani. U visokim koncentracijama F2-izoprostani mogu dovesti do razvoja hepatorenalnog sindroma, koji je posledica njihovog vazokonstriktivnog delovanja u plućima i bubrezima. [13]

2.4. Antioksidansi

Kada dođe do prekomernog stvaranja slobodnih radikala, organizam ima nekoliko mehanizama stvaranja antioksidanasa kako bi neutralizovao neželjeno delovanje slobodnih radikala, sprečio nastanak oksidativnog stresa i time zaštitio ćeliju od toksičnih delovanja, čime sprečava nastanak bolesti povezanih sa oksidativnim stresom. Poreklo antioksidanasa u organizmu može biti endogeno (antioksidansi nastaju *in situ*) i egzogeno (uneti konvencionalnom hranom ili putem suplemenata). Endogeni antioksidansi mogu biti enzimskog i neenzimskog porekla. Postoji nekoliko mehanizama delovanja antioksidanasa kojima se može sprečiti delovanje slobodnih radikala. [9].

Najznačajniji enzimski antioksidansi koji učestvuju u primarnoj antioksidativnoj zaštiti su superoksid dizmutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GPx), glutation reduktaza (GRx) i glutation-S-transferaza. [14] Superoksid dizmutaza može se naći u više izoformi u ljudskom organizmu, koje se međusobno razlikuju prvenstveno po lokalizaciji i metalu koji se nalazi u aktivnom centru enzima. Citozolna SOD u svom aktivnom centru sadrži bakar i cink (Cu,Zn-SOD), isto kao i ekstracelularna SOD (EC-SOD), dok mitohondrijalna SOD u svom aktivnom centru sadrži mangan (Mn-SOD). Sve izoforme SOD katalizuju reakciju dismutacije superoksidnog anjona (O_2^-) u vodonik-peroksid (H_2O_2) i molekul kiseonika (O_2) redukcijom. Dalje se, nastala oksidovana forma, H_2O_2 , transformiše do vode (H_2O) i kiseonika (O_2) pod uticajem katalaze (CAT) ili glutation peroksidaze (GPx). GPx je selenprotein, koji dovodi do razgradnje H_2O_2 , tako što oksiduje redukovanu formu glutationa (GSH) i prevodi je u oksidovani oblik (GSSG). Osim H_2O_2 , GPx istim principom redukuje i druge lipidne i nelipidne hidroperokside. Glutation reduktaza (GRx) je flavoprotein, koji ima ulogu u regeneraciji glutationa iz oksidovanog (GSSG) oblika u redukovani (GSH) oblik uz pomoć NADPH. [9], [2] Glutacion-S-transferaza omogućava vezivanje glutationa za centre hidrofobnih molekula preko sulfhidrilnih grupa i time im omogućava rastvaranje u vodi i lakši transport do vakuola. [1] Osim enzima koji učestvuju u primarnoj antioksidativnoj zaštiti, postoje i enzimi koji vrše tercijalnu antioksidativnu zaštitu (sekundarnu antioksidativnu zaštitu

uglavnom vrše neenzimski antioksidansi) tako što vrše popravku oštećene DNK, resintezu oštećenih aminokiselina i proteina, kao i uklanjanje oksidovanih masnih kiselina lipida membrane. U ove enzime spadaju enzimi koji vrše reparaciju DNK (polimeraze, glikozilaze, nukleaze) i proteolitički enzimi (proteinaze, proteaze i peptidaze). [14], [1]

Neenzimski antioksidansi mogu se podeliti na one koji dovode do prekida lančane reakcije i metal vezujuće proteine. [15] Molekuli koji deluju kao antioksidansi mogu imati sposobnost doniranja, tj. primanja elektrona, kako bi stabilizovali slobodni radikal, a mogu i direktno reagovati sa slobodnim radikalom i tako dovesti do njegove neutralizacije („skevindžer“ antioksidansi). Ovim procesom i sam antioksidans može dobiti nesparesni elektron i time postati slobodni radikal, ali je tako nastali slobodni radikal znatno manje reaktivan i manje opasan. Ovako nastali slobodni radikal može biti neutralisan drugim antioksidansom ili nekim drugim mehanizmom, koji će dovesti do promene oblika, kako bi nastali molekul izgubio slobodnoradikalisku aktivnost (delokalizacija nesparesnih elektrona u aromatičnom prstenu, delovanje enzimskih antioksidanasa). [16] Na ovaj način antioksidansi mogu dovesti do prekida lančane reakcije, koja je posebno izražena u procesu lipidne peroksidacije. Gvožđe i bakar u organizmu imaju ulogu prenosnika elektrona između kiseonika i drugih biomolekula, čime dolazi do stvaranja alkoksil radikala. Metal vezujući proteini, kao što si feritin, trasferin, laktoferin i ceruloplazmin dovode do vezivanja Fe^{2+} i Cu^{+} i tako sprečavaju nastanak alkoksil radikala i hidrosil radikala u Fentonovoj reakciji. Najznačajni neenzimski antioksidansi su vitamin C, mokraćna kiselina, glutation (tioli) koji pripadaju hidrofилnoj grupi antioksidanasa i vitamin E, koenzim Q10 (ubikvinol), karotenoidi i flavonoidi, koji su lipofilni antioksidansi. [13], [15]

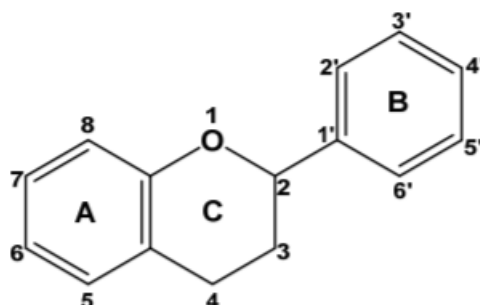
Egzogeni antioksidansi nemaju mogućnost sinteze u organizmu i moraju se obezbediti iz hrane i drugih suplemenata. Najznačajniji egzogeni antioksidansi su vitamin C, vitamin E, elementi u tragu (selen, bakar, cink), karotenoidi, polifenoli, flavonoidi, omega 3- i omega 6-masne kiseline. Pokazano je da deficit nutritivnih antioksidanasa može dovesti do razvoja različitih oboljenja. [9] Zbog potrebe za dodatnim unosom antioksidanasa došlo je do razvoja sintetskih antioksidanasa, kao što su butil hidroksitoluen (BHT) i butil hidroksianizol (BHA). Međutim, zbog svoje moguće toksičnosti, oni se danas koriste samo kao aditivi u prehrambenoj industriji, ali ne i kao suplementi. Iz tih razloga, istraživanja su usmerena na pronalaženje prirodnih antioksidanasa, uglavnom iz biljaka, koji bi se mogli koristiti kao dijetetski suplementi. Voće, povrće, žitarice, začini, lekovito bilje sadrže različite grupe antioksidanasa, kao što su karotenoidi, steroidi, tioli, flavonoidi i polifenoli. [16] U poslednje vreme, polifenoli sve više privlače pažnju istraživača zbog njihovog povoljnog efekta na zdravlje ljudi. [17]

2.5. Polifenoli

Polifenoli predstavljaju sekundarne metabolite biljaka čija je osnovna uloga u odbrani biljke od patogena i ultraljubičastog (UV) zračenja. Neka istraživanja pokazuju da ishrana bogata biljkama koje sadrže polifenole može u određenoj meri povoljno uticati na smanjenje razvoja karcinoma, kardiovaskularnih bolesti, osteoporoze, dijabetesa i neurodegenerativnih oboljenja. [17] Preko 8000 različitih polifenolnih jedinjenja je pronađeno u različitim vrstama biljaka, od čega najveći deo čine flavonoidi, koji su i najviše bioaktivni. Postoji više metaboličkih puteva nastanka polifenola, ali najveći broj polifenolnih jedinjenja nastaje metaboličkim putem šikimske kiseline, u kome dolazi do

stvaranja fenilalanina i tirozina, koji su glavni prekursori u daljem stvaranju polifenola. [18] Polifenoli se uglavnom nalaze u konjugovanom obliku, za koji je putem hidroksilnih grupa vezan jedan ili više saharidnih ostataka, mada se mogu naći i forme gde su saharidi direktno povezani sa aromatičnim prstenom. Osim veze sa saharidima, sreću se i veze sa drugim jedinjenjima, kao što su masne kiseline, amini, lipidi i drugi fenoli. [17]

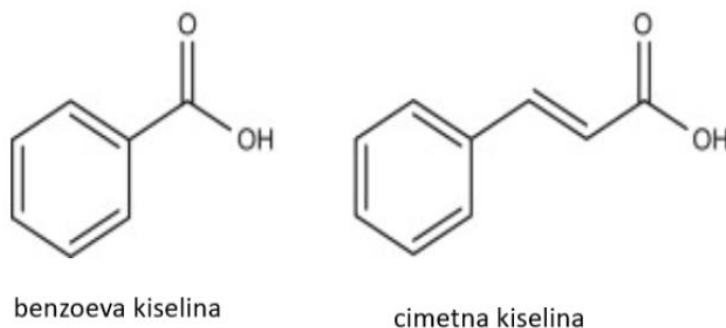
Flavonoidi se sastoje od dva aromatična prstena, međusobno povezana sa tri alifatična C atoma, koji sa kiseonikom formiraju hetrociklin (piran). Do sada je opisano oko 4000 različitih flavonoida, a na osnovu razlike u strukturi hetrocikličnog prstena, mogu se podeliti u šest grupa: flavonoli, flavoni, flavanoli (katehini), flavanoni, antocijanidini i izoflavonoidi (slika 4). [17], [19]



Slika 4. Osnovna struktura flavonoida [19]

Razlike koje nastaju između samih grupa i svakog flavonoida pojedinačno, leže u velikom broju modifikacija osnovne strukture. Kvercetin, miricetin, kamferol, katehin su neki od najzastupljenijih flavonoida. Nakon flavonoida, druga najzastupljenija grupa polifenolnih jedinjenja su fenolne kiseline. [17], [19]

Fenolne kiseline predstavljaju proste polifenole, uglavnom malih molekulskih masa, koje se sastoje iz fenolnog jezgra i bočnog niza koji sadrži jedan (derivati benzojeve kiseline) ili tri (derivati cimetne kiseline) ugljenikova atoma (slika 5). One obuhvataju hidroksi i druge funkcionalne derivate benzojeve, tj. hidroksibenzojeve i cimetne kiseline, odnosno hidroksicimetne kiseline. [20]



Slika 5. Benzojeva i cimetna kiselina

Najčešći derivati hidroksicimetne kiseline su *p*-kumarinska, kafena, ferulna i sinapinska kiselina. Jedan od najrasprostranjenijih derivata hidroksicimetne kiseline je hlorogenska kiselina, koja predstavlja estar kafene i hininske kiseline. [18] Ruzmarinska kiselina je takođe estar kafene kiseline i 3,4-dihidroksifenillaktatne kiseline. [21]

Najpoznatiji derivati hidroksibenzojeve kiseline su *p*-hidroksibenzojeva kiselina, salicilna kiselina, vanilinska kiselina i siringinska kiselina. Aldehidi fenolnih kiselina se takođe svrstavaju u ovu grupu (vanilin, siringaldehid). [18] Osim već navedenih, fenolnim kiselinama pripada i elaginska kiselina, koja predstavlja derivat galne kiseline, koji nastaje laktonizacijom heksahidroksidifenske kiseline (HHDP), kondenzacionog proizvoda dva molekula galne kiseline. [19] Fenolne kiseline se veoma retko nalaze u slobodnoj formi i uglavnom se mogu naći u obliku glukozida, povezani sa malim organskim kiselinama (estri) ili vezani za strukturne elemente biljke, kao što su celuloza, proteini ili lignini. [18]

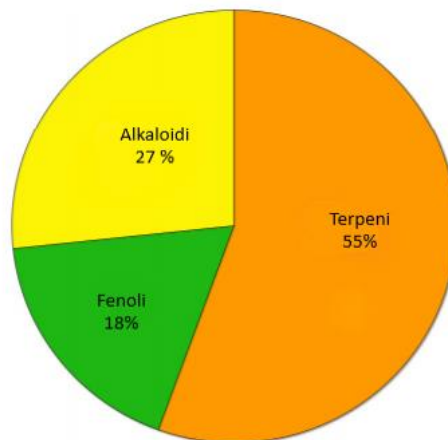
Iako su flavonoidi i fenolne kiseline najzastupljenije grupe polifenola, osim njih, po strukturi se odvajaju još dve grupe polifenolnih jedinjenja, a to su stilbeni i lignani. Stilbeni su veoma malo zastupljeni u ishrani, a većina njih u biljkama deluju kao antifungicidni fitoalekseni (komponente koje biljke sintetišu kao odgovor na infekciju ili povredu). Najviše izučavan stilben je rezveratrol, koji se može naći u grožđu i crvenom vinu. Lignani su poznati kao fitosetrogeni, a najveći izvor lignana je laneno seme, koje sadrži sekoizolaricirezinol i u malim količinama matairezinol. [17]

Antioksidativno delovanje polifenola zavisi od njihove strukture i funkcionalnih grupa. Polifenoli smanjuju produkciju ROS tako što vrše inhibiciju enzima koji učestvuju u njihovom stvaranju, mogu direktno da „hvataju“ ROS, heliraju metalne jone (kvercetin helira gvožđe) i vrše regulaciju sistema antioksidativne zaštite. Takođe, polifenoli mogu uticati na plazma membranu, tako što reaguju sa nepolarnim komponentama koje se nalaze u unutrašnjem, hidrofobnom sloju plazma membrane, čime vrše uticaj na oksidaciju lipida i proteina. Na ovaj način, određeni flavonoidi sprečavaju delovanje oksidanasa i tako čuvaju strukturu i integritet ćelijske membrane. [22]

Osim polifenola, značajnu grupu sekundarnih metabolita biljaka, koji takođe pokazuju antioksidativno delovanje, čine terpeni. Terpeni, takođe pokazuju i antiinflamatorno, antiagregacijsko, antikoagulativno, antitumorsko, kao i sedativno i analgetsko delovanje. [5], [23]

2.6. Terpeni

Pored polifenolnih jedinjenja, kojih ima oko 8000, i alkaloida kojih ima oko 12000, terpeni i terpenoidi sa oko 25000 različitih jedinjenja, čine najveću grupu sekundarnih metabolita biljaka, koji nastaju kao odgovor na stres, tj. deo su odbrambenog sistema biljke od različitih spoljnih faktora i patogena (slika 6). [5], [24]

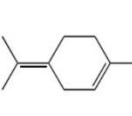
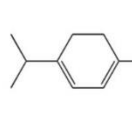
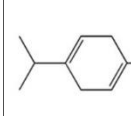
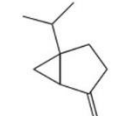
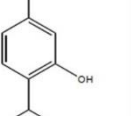
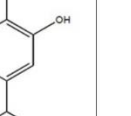
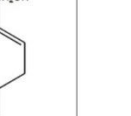
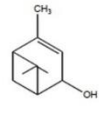
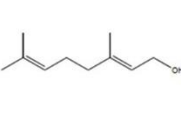
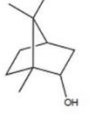
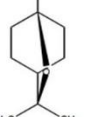
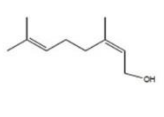
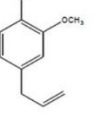


Slika 6. Najveće grupe sekundarnih metabolita biljaka i njihovi udeli [24]

Terpeni su strukturno sastavljeni iz izoprenskih jedinica, tj. izopentil-difosfata (IPP), odnosno njegovog izomera dimetilalil-difosfa (DMAPP) (5C-atoma), gde jedna izoprenska jedinica zapravo predstavlja najjednostavniji oblik, hemiterpen. Spajanjem dve izoprenske jedinice nastaje monoterpen (C10), dok spajanjem tri izoprenske jedinice nastaju seskviterpeni (C15). Daljim povezivanjem izoprenskih jedinica nastaju di- (C20), tri- (C30), tetra- (C40) i politerpeni. Biosinteza terpena u biljkama se odvija u dva različita puta: put mevalonske kiseline (MVA) put, koji se odvija u citoplazmi i nemevalonatni put, tj. metileritritol fosfatini put (MEP), koji se odvija u plastidima. Termin terpeni, uglavnom se odnosi na ugljovodonične terpene, dok se terpeni koji su podlegli biohemijskim modifikacijama, kao što je npr. proces okidacije, nazivaju terpenoidima. [23], [24]

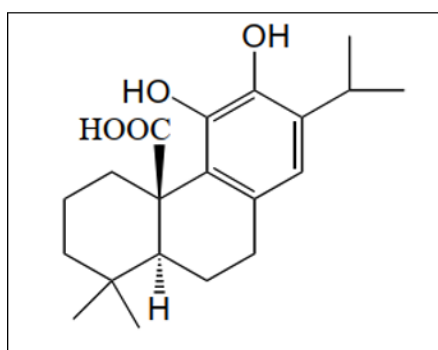
Terpeni svoje antioksidativno delovanje ostvaruju direktnom neutralizacijom („hvatanjem“) ROS i uticajem na endogene antioksidanse. Zahvaljujući svom antioksidativnom delovanju, terpeni su pokazali značajan učinak u stanju oksidativnog stresa kod različitih oboljenja, kao što su bolesti jetre, bubrega, neurodegenerativna oboljenja, kardiovaskularne bolesti, karcinom, dijabetes, uključujući i proces starenja. Antioksidativna aktivnost terpena, u nekim slučajevima može biti odgovorna za njihovu mogućnost da vrše modulaciju prenosa nervnog signala, utiču na proces inflamacije i imaju uticaj na imunološki sistem. Delovanje terpena u velikoj meri zavisi od koncentracija u kojima se nalaze. Iako pokazuju antioksidativno delovanje, koje je izraženo kada se nalaze u niskim koncentracijama, terpeni u visokim koncentracijama pokazuju prooksidativno delovanje. [25]

Kada su u pitanju ugljovodonični monoterpeni, najveću antioksidativnu aktivnost pokazuju terpinolen, α -terpinen, γ -terpinen i sabinen, dok što se tiče oksidovanih terpena, najbolje su se pokazali monoterpenski fenoli: timol i karvakrol. Osim monoterpenskih fenola, antioksidativnu aktivnost poseduju i alilni alkoholi: nerol, perilil alkohol, geraniol i cis-verbenol, dok monoterpenski ketoni i aldehidi poseduju nešto slabiju antioksidativnu aktivnost. Ugljovodonični seskviterpeni ispoljavaju dosta nisku antioksidativnu aktivnost, dok je antioksidativna aktivnost oksidovanih seskviterpena na sličnom nivou, kao i antioksidativna aktivnost oksidovanih monoterpena (alilnih alkohola) (slika 7). [25]

						
terpinolen	α -terpinen	γ -terpinen	sabinen	timol	karvakrol	perillil alkohol
						
verbenol	geraniol	borneol	1,8-cineol	nerol	eugenol	

Slika 7. Hemijska struktura monoterpena sa antioksidativnom aktivnošću [25]

Diterpeni, posebno fenolni abietan, karnosinska kiselina, koja je izolovana iz ruzmarina, poseduje bolje antioksidativno delovanje od askorbinske kiseline (slika 8). Triterpeni, osim što deluju kao „hvatači“, neki imaju i osobinu da heliraju gvožđe, dok se antioksidativna aktivnost tetraterpena uglavnom bazira na delovanju karotenoida (β -karoten, α -karoten, likopen, lutein), koji su se zbog višestrukih veza u svojoj strukturi pokazali kao dobri „hvatači“ ROS. Što je veća dužina konjugovanog sistema, karatenoidi ispoljavaju bolje antioksidativne osobine. [25]



Slika 8. Karnosinska kiselina [25]

Osim što poseduju antioksidativnu aktivnost, terpeni stupaju u interakciju sa drugim molekulima koji su bitni za fiziološke procese u organizmu, pa tako mogu delovati kao imunostimulansi, uticati na koagulacione procese krvi, vršiti modulaciju transkripcionih faktora, kao što je nuklearni faktor *kappa* B (NF- κ B), koji je povezan sa procesom inflamacije u raznim hroničnim bolestima, kao što su kardiovaskularne bolesti, dijabetes i Alzhajmer i druge. Neki od terpenoida, pokazuju delovanje i protiv ćelija karcinoma, malarije, a u nekim slučajevima mogu delovati i antivirusno i antibakterijski. [23]

Ekstrakti različitih aromatičnih biljaka, među koje spadaju i eterična ulja i hidrolati, bogati su terpenima i terpenoidima. [23]

2.7. Hidrolati

Hidrolati, ili kako se još nazivaju hidrosoli ili cvetne vode, predstavljaju vodenu fazu koja nastaje tokom parne, odnosno vodene destilacije aromatičnog bilja u procesu

dobijanja eteričnog ulja. Tokom destilacije, određene komponente eteričnih ulja ostaju rastvorene u vodenoj fazi. U hidrolatima se nalaze rastvorene hidrosolubilne komponente eteričnih ulja, a mogu se i u veoma maloj količini naći i čestice samog eteričnog ulja, kao i ostale hidrosolubilne komponente biljke koja se destiluje, zbog čega imaju intezivan miris i ukus. Zbog prisustva hidrofilnih supstanci biljaka, koje uglavnom čine različite kiseline, pH vrednost hidrolata se najčešće kreće između 4,5 i 5,5, što ih čini pogodnim za negu kože i zbog čega mogu delovati antibakterijski. [26], [27] Hidrolati ne poseduju nepovoljne osobine eteričnih ulja kao što je jak miris koji može izazvati glavobolju, iritaciju kože ili očiju i iz tih razloga mogu se bezbedno primeniti na koži, ali i oralno nakon odgovarajuće obrade i razblaživanja. U Evropi, Aziji i Africi, hidrolati su se tradicionalno primenjivali u narodnoj medicini, pripremi hrane, kozmetici. Zbog svih navedenih osobina, hidrolati su našli svoju primenu uglavnom u kozmetičkoj industriji, ali i u industriji hrane. [28] Sve je veća primena hidrolata i kao funkcionalnih napitaka. Funkcionalni napici predstavljaju bezalkoholna pića, koja sadrže sastojke, kao što su biljke, vitamini, minerali, sveže voće ili povrće, koji se konzumiraju kako bi obezbedili specifične zdravstvene pogodnosti (podizanje energije, jačanje imunološkog sistema, itd.), mimo onih koje pruža regularna ishrana. [29]

Sastav hidrolata, kao i sastav eteričnih ulja aromatičnih biljaka, zavisi od brojnih faktora koji uključuju genetiku biljke, klimatske faktore, način uzgajanja biljke (svetlost, obrada zemljišta, primena đubriva, itd.), kao i metode koje se primenjuju u obradi i izolovanju istih.[30] Tako npr, hidrolati koji se sakupljaju na početku destilacije imaju prijatniji miris od onih koji se sakupljaju na kraju destilacije, zbog razlike u prisustvu terpenoida koji ključaju na nižim, odnosno višim temperaturama. Takođe, smatra se da su hidrolati, koji su sakupljeni ili u ranoj ili u kasnoj fazi destilacije, korisniji u terapijske svrhe od onih koji su sakupljeni tokom celog procesa destilacije. [28] Sastav hidrolata značajno se razlikuje od sastava etričnih ulja iste biljke zbog različite rastvorljivosti određenih komponenti u vodenoj fazi, zbog čega se razlikuje i njihova biološka aktivnost. [29] Glavne komponente hidrolata uglavnom predstavljaju terpeni i terpenoidi, od kojih i potiču antioksidativne, ali i antibakterijske, antivirusne i druge osobine koje različiti hidrolati poseduju. Tako glavne komponente hidrolata ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*) predstavljaju oksidovani monoterpeni, među koje spadaju verbenon, α -terpineol, kamfor, borneol, terpinen-4-ol, 1,8-cineol i drugi, dok glavne komponente hidrolata lavande (*Lavandula angustifolia*) čine lanalool, lanalool oksid, borneol, α -terpineol i terpinen-4-ol. [30], [31] Hidrolat žalfije (*Salvia officinalis*) takođe sadrži 1,8 cineol, ali je dominantna komponenta ovog hidrolata kamfor, zbog čega hidrolat žalfije pokazuje slabije antioksidativne osobine. [26]

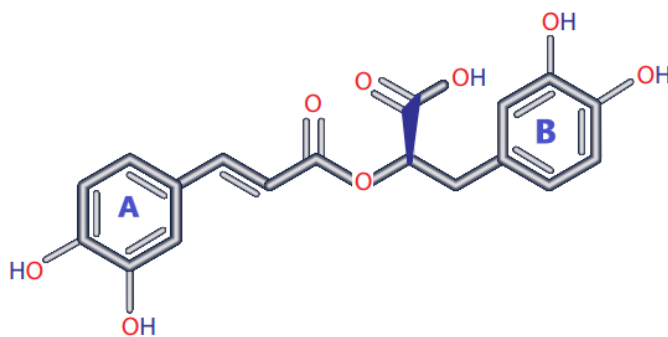
Zbog velikih varijacija u sastavu hidrolata, značajno se razlikuju i njihove antioksidativne, ali i druge osobine koje mogu imati uticaj na zdravlje ljudi. Kombinovanjem više različitih hidrolata, može se postići efekat sinergije i samim tim poboljšati njihovo antioksidacijsko delovanje, ali i drugi efekti koje različiti hidrolati poseduju.

2.8. Ruzmarinska kiselina

Biljke iz porodica Usnatica (Lamiaceae) široko su rasprostranjene kao biljke koje se koriste u tradicionalnoj medicini, kako u lečenju, tako i u prevenciji različitih bolesti.

Većina vrsta iz porodice su aromatične i sadrže aromatična ulja, pa se neke od njih uzgajaju kako bi se upotrebljavale i u ishrani, kao što su bosiljak (*Ocimum spp.*), menta (*Mentha × piperita*), ruzmarin (*Rosmarinus officinalis*), žalfija (*Salvia officinalis*), čubar (*Satureja hortensi*), majoran (*Origanum majorana*), origano (*Origanum vulgare*), timijan (*Thymus vulgaris*) i lavanda (*Lavandula angustifolia*). [5] Ove biljke poseduju antioksidativne, antiinflamatorne, antialergijske i antimikrobne osobine, koje se uglavnom pripisuju delovanju polifenolnih jedinjenja, koja su jedna od glavnih grupa jedinjenja koje ove biljke poseduju, među koje spada i ruzmarinska kiselina. [32]

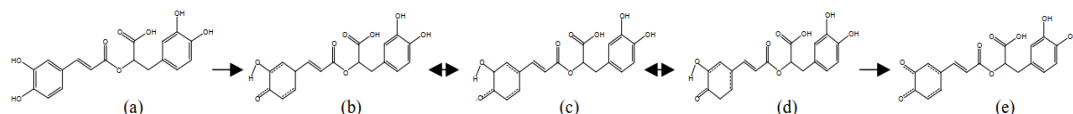
Ruzmarinska kiselina (Rosmarinic acid – RA) prvi put je izolovana iz listova ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*), a kasnije i iz drugih biljaka porodica Lamiaceae i Boraginaceae, kao i iz nekih viših biljaka, paprati i drugih. Iako je pronađena i u mnogim drugim biljkama, ruzmarin se i dalje koristi kao najveći izvor ruzmarinske kiseline. Strukturno gledano, ruzmarinska kiselina predstavlja ester kafene kiseline i 3,4-dihidroksifenilaktatne kiseline, gde deo koji se sastoji od kafene potiče od fenilalanina, dok deo koji se sastoji od 3,4-dihidroksifenilaktatne kiseline, vodi poreklo od tirozina (slika 9). [21], [32], [33]



Slika 9. Ruzmarinska kiselina [21]

Različite *in vitro* studije pokazale su da RA pokazuje antivirusne osobine, uključujući i delovanje na anti-HIV-1, kao i antibakterijske, antioksidativne, antikancerogene i antialergijske osobine, dok su *in vivo* studije, pokazale antialergijsko, antitrombotno, antikancerogeno i antireumatoidno delovanje RA. [32], [34]

Antioksidativno delovanje fenolnih kiselina, a samim tim i ruzmarinske kiseline, zavisi od njihove strukture, tj. supstituenata i njihovog položaja na aromatičnom prstenu i strukture bočnog niza. Veći broj hidroksilnih i metoksilnih grupa i naročito prisustvo *o*-dihidroksi grupe na fenolnom prstenu povećava antioksidativnu aktivnost. [35] Ruzmarinska kiselina deluje kao „hvatač“ ROS tako što ima mogućnost doniranja vodonika, tj. elektrona sa *o*-hidroksilnih grupa prstena A i B (slika 9). Ovo dalje vodi ka formiranju semikvinonske i kvinonske strukture, što stabilizuje nastalu slobodno radikalsku strukturu (slika 10). Aktivnost prstena A slična je aktivnosti prstena B, iako je prsten B jači donor elektrona, dok je slobodni radikal nastao odlaskom vodonikovog atoma sa prstena A stabilniji u odnosu na radikal nastao odlaskom vodonikovog atoma sa prstena B. [36]



Slika 10. Formiranje semikvinonske i kvinonske strukture RA [36]

Osim što deluje kao „hvatač“ ROS, RA inhibira ksantin oksidazu (katalizuje reakciju stvaranja hipoksantina u ksantin, a potom ksantina u mokraćnu kiselinu, pri čemu dolazi do stvaranja H_2O_2), koja je u određenim patofiziološkim stanjima, kao što je ishemija ili povreda tkiva, jedan od endogenih izvora nastanka slobodnih radikala u organizmu. Takođe, RA redukuje Mo (VI) do Mo (V) sprečavajući time nastanak slobodnih radikala izazvan metalima. [36], [37]

Kao i drugi polifenoli, i RA ima mogućnost infiltracije u unutrašnji, nepolarni sloj plazma membrane, čime sprečava lipidnu peroksidaciju sa jedne strane presretajući intramembranske radikale i sa druge strane povećavajući protočnost membrane, čime se vrši deorgainizacija lipidnih lanaca i otežava propagacija stvaranja radikala. [38] Osim što sprečava lipidnu peroksidaciju, RA povećava produkciju enzima koji učestvuju u primarnoj antioksidativnoj zaštiti: superoksid dizmutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation peroksidaze (GPx). [39] Za razliku od drugih polifenola, kao što su luteolin i kvercetin, koji samo sprečavaju oštećenje DNK delujući antioksidativno, RA pored toga indukuje i reparaciju već oštećene DNK, posredujući u intacelularnom mehanizmu odgovornom za DNK reparaciju. [40]

Iz svega navedenog može se zaključiti da ruzmarinska kiselina svoje antioksidativno delovanje ispoljava na gotovo svim nivoima antioksidativne zaštite, počevši od direktnog delovanja na slobodne radikale, sprečavanja lipidne peroksidacije, indukcije enzima odgovornih za primarnu antioksidativnu zaštitu, do indukcije mehanizma reparacije.

2.9. Med

Med je prirodna, slatka supstanca koju proizvode medonosne pčele (*Apis mellifera*) preradom nektara biljaka, ili iz sokova sa živih delova biljaka, ili sakupljanjem ekskreta insekata koji se hrane sišući sokove sa živih delova biljaka, koje pčele sakupljaju, prerađuju i dodaju sopstvene specifične supstance, dehidriraju i odlažu u ćelije saća do sazrevanja. [41] Med pored svojih nutritivnih vrednosti, zahvaljujući bioaktivnim supstancama koje sadrži pokazuje i određene terapijske efekte. Glavni efekti bioaktivnih komponenti meda su antibakterijsko i antioksidativno delovanje.

Sastav meda, kao i njegove antoksidativne i druge osobine, zavise od cvetova iz kojih se uzima nektar, godišnjeg doba, geografskog porekla i drugih faktora sredine, kao i obrade meda, zbog čega je sastav flavonoida u medu povezan sa poreklom cveta iz koga je med nastao. Brojne lekovite i aromatične biljke vrše sintezu supstanci sa antioksidativnim delovanjem koje mogu biti prenete u med, pa se tako određene komponente meda mogu koristiti kao markeri botaničkog porekla meda (hesperitin kao marker citrusnog meda, 8-metoksi-kempferol kao marker ruzmarinovog meda, luteolin kao marker lavandinog meda).

Boja meda zavisi od pH vrednosti, sadržaja pepela, polena, porekla cveta, kao i antioksidativnih pigmenata kao što su karotenoidi i flavonoidi, pa se smatra da tamniji medovi imaju bolja antioksidativna svojstva. [42], [43]

Med svoje antibakterijske osobine pokazuje zahvaljujući visokom sadržaju šećera, niskoj aktivnosti vode, prisustvu H_2O_2 , jakih kiselina, flavonoida, fenolnih kiselina, metilglioksala i pčelinjeg peptida defensin-1, dok su antioksidativne osobine izražene zahvaljujući flavonoidima i fenolnim kiselinama, vitaminu C, vitaminu E, enzimima, kao što su katalaza i peroksidaza, i elementima u tragu. Antibakterijska i antioksidativna delovanja meda su međusobno povezana, utiču jedna na druge i zajedno medu daju posebne terapijske karakteristike. [6]

Antioksidativna aktivnost meda jeste direktno povezana sa sadržajem polifenola i flavonoida, ali zavisi i od drugih komponenti, kao što je sadržaj metala (Na, K, Ca, Mg) i drugih neenzimskih komponenti meda, koje zajedno sa polifenolima i flavonoidima deluju sinergistički. [43]

3. Eksperimentalni deo

3.1. Cilj rada

Glavni cilj rada je ispitivanje antioksidativne aktivnosti preparata Med(i)ra (proizvođač ROSA VITA d.o.o, Pula, Hrvatska), koji je napravljen na bazi biljnih kompleksa (hidrolata), ruzmarinske kiseline i meda u uslovima *in vitro* indukovano oksidativnog stresa u biološkom uzorku.

Ostali ciljevi, kroz koje se ostvaruje glavni cilj rada su:

- utvrđivanje koncentracije merenih parametara oksidativnog stresa pre i nakon dodavanja prooksidansa, terc-butil hidroperoksid (TBH) u uzorke koji sadrže ispitivani preparat, čist serum i troloks.
- utvrđivanje antioksidativnog potencijala preparata Medi(i)ra u odnosu na standardni antioksidans vitamin E, u obliku troloksa (2 mmol/L).

3.2. Materijal i metode

Za ovo istraživanje korišćen je „pool“ seruma dobijen mešanjem seruma zdravih pojedinaca, preparat Med(i)ra, kao izvor antioksidanasa, 0,25 mmol/L TBH, kao prooksidans i troloks (2 mmol/L), hidrosolubilni analog vitamina E, kao preparat sa poznatim antioksidativnim delovanjem.

Preparat Med(i)ra (proizvođač ROSA VITA d.o.o, Pula, Hrvatska) sastoji se iz biljnih kompleksa, tj. iz hidrolata četiri biljne vrste: ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*), lavande (*Lavandula angustifolia*), komorača (*Foeniculum vulgare*) i primorske kleke (*Juniperus oxycedrus*), zatim dodatka ruzmarinske kiseline (75 mg RA/10 mL proizvoda), kao jednog od vodećih antioksidanasa i meda, koji potiče sa polja aromatičnog bilja, koje se koristi i za izradu hidrolata koji ulaze u sastav preparata.

U alikvotne seruma zapremine 450 μ L, u duplikatu dodata je serija razblaženja (100%, 50%, 25%) ispitivanog preparata u zapremini od 50 μ L, zatim serija razblaženja ispitivanog preparata (100%, 50%, 25%) i TBH, kao prooksidans u ukupnoj zapremini od 50 μ L (25 μ L + 25 μ L). Pored ovih uzoraka, pripremljeni su i uzorci u koje je dodat samo TBH (50 μ L), troloks kao standardni antioksidans (50 μ L), TBH zajedno sa troloksom (25 μ L + 25 μ L) i kontrolni serum sa dodatkom destilovane H₂O (50 μ L). Uzorci su inkubirani u vodenom kupatilu 2h na 37°C, nakon čega je iz svih uzoraka vršeno određivanje parametara oksidativnog stresa: totalnog antioksidativnog statusa (TAS), paraoksonaze-1 (PON1), ukupnog sadržaja sulfhidrilnih grupa (SHG), totalnog oksidativnog statusa (TOS), prooksidativnog-antioksidativnog balansa (PAB) i uznapredovalih produkata oksidacije proteina (AOPP).

Totalni antioksidativni status (TAS) meri ukupnu reaktivnost svih redukujućih supstanci u plazmi, pre svega proteina, mokraćne kiseline, glukoze, uree i kreatinina, vitamina E i C.

Totalni antioksidativni status određen je kolorimetrijskim testom uz upotrebu stabilnog ABTS+ katjona kao hromogena. Sam rastvor ABTS-a je bezbojan. Oksidacijom do ABTS+ katjona, pomoću vodonik-peroksida u kiselom medijumu (acetatni pufer, pH=3,6) rastvor dobija karakterističnu smaragdnu boju. Kada se obojeni ABTS+ jon pomeša sa nekom supstancom koja može da se oksiduje (antioksidans), redukuje se do bezbojnog ABTS-a, što se manifestuje promenom boje, odnosno obezbojavanjem ispitivanog rastvora. Intenzitet obezbojavanja srazmeran je koncentraciji prisutnih ukupnih antioksidanasa u uzorku. Apsorbancije ispitivanih rastvora očitavane su na talasnoj dužini od 660 nm, nakon inkubacije od 10 minuta, na sobnoj temperaturi (ili 5 minuta, 37°C). Za očitavanje apsorbance korišćen je automat Ilab 300+ (Instrumentation Laboratory, Milan, Italy). [44]

Paraoksonaza 1 (PON1) je enzim čija se sinteza odigrava u jetri i ulazi u sastav HDL (High Density Lipoprotein) lipoproteinskih čestica. PON1 ima sposobnost da spreči stvaranje novih i razgradi već postojeće LDL (Low Density Lipoprotein) čestice, i ima značajnu ulogu pri zaštiti LDL čestica od oksidativne modifikacije, što doprinosi antioksidativnom potencijalu organizma. [45]

Određivanje PON1 statusa (prema metodi Richtera i Furlonga) podrazumeva određivanje aktivnosti enzima PON1 prema dva različita nefiziološka supstrata, paraoksonu (paraoksonazna, POazna aktivnost) i diazoksonu (diazoksonazna, DZOazna aktivnost) i na osnovu toga određivanje fenotipa aktivnosti za položaj 192.

Aktivnost enzima se određuje u serumu ili hepariniziranoj plazmi. EDTA plazma se ne može koristiti pošto po nekim autorima EDTA direktno dovodi do degradacije PON1(127) a po drugima PON1 je Ca^{2+} -zavisna esteraza čija je aktivnost blokirana u prisustvu EDTA koji kompleksira Ca^{2+} . U ovoj studiji je korišćen serum.

Određivanje paraoksonazne aktivnosti se zasniva na delovanju PON1 enzima iz seruma na supstrat paraokson, pri čemu dolazi do konverzije paraoksiona do p-nitrofenola; brzina te promene se prati kinetički na 405 nm, gde je karakteristični apsorpcioni maksimum za p-nitrofenol koji se u baznoj sredini nalazi u obliku p-nitrofenoksidnog anjona.

Određivanje diazoksonazne aktivnosti se zasniva na delovanju PON1 enzima iz seruma na supstrat diazokson (diazinon-O-analog), pri čemu dolazi do konverzije diazoksiona do 2-izopropil-4-metil-6-hidroksipirimidina (IMHP); brzina te promene se prati kinetički na 270 nm, gde je karakteristični apsorpcioni maksimum za IMHP. Za očitavanje apsorbance korišćen je Ilab 300+ (Instrumentation Laboratory, Milan, Italy). [44]

Ukupne sulfhidrilne grupe (SHG) su deo antioksidativne zaštite i uglavnom potiču od proteina. Neka neproteinska jedinjenja našeg organizma (antioksidans glutation) takođe sadrže ove grupe sa redukujućim sposobnostima čija je funkcija neutralisanje slobodnih radikala. Pored TAS-a, SHG čine prvu linije odbrane u našoj krvi od oksidativnog stresa.

Ukupni sadržaj sulfhidrilnih grupa u plazmi se određuje Ellman-ovom metodom. Ova metoda se zasniva na reakciji 2,2'-dinitro-5,5'-ditio-benzojeva kiseline (DTNB) sa alifatičnim tiolnim jedinjenjima u baznoj sredini (pH 9.0), pri čemu se stvara jedan mol p-

nitrofenol anjona po jednom molu tiola. Pošto je ovaj anjon u baznoj sredini jako žuto obojen, merenje njegove apsorpcije je moguće na 412 nm. Ukupan sadržaj SH grupa se može odrediti preko standardne krive vodenog rastvora glutaciona, ili preko molarnog ekstincionog koeficijenta para-nitrofenola na 412 nm. [44]

Totalni oksidativni status (TOS) meri sve oksidujuće supstance u plazmi tipa vodonik-peroksida i lipidnih hidroperoksida. Ovaj parametar je u direktnoj vezi sa TAS antioksidansom, ako je jedan povišen, drugi je snižen i obratno. TOS oslikava oksidativni potencijal plazme, tj. postojanje komponenti koje mogu potencijalno da oštete ćelije i tkiva.

Kao glavne komponente TOS sistema u serumu su prisutni H_2O_2 i lipidni hidroperoksidi. Ukupni oksidansi prisutni u uzorku oksiduju fero jon-orto-dianizidni kompleks u feri jon. Reakcija oksidacije olakšana je molekulom glicerola koji je prisutan u reakcionom medijumu. Nastali feri jon zatim gradi obojeni kompleks sa ksilenol-oranžom u kiseloj sredini. Intenzitet boje se meri spektrofotometrijski ($\lambda=560$ nm) i proporcionalan je ukupnom sadržaju oksidacionih molekula u uzorku. Za očitavanje apsorpcije korišćen je automat Ilab 300+ (Instrumentation Laboratory, Milan, Italy). [44]

Prooksidativni-antioksidativni balans (PAB) omogućava merenje opterećenosti prooksidansima i kapacitet antioksidanasa određenog organizma u isto vreme. U odnosu na dosadašnje metode uz pomoć kojih se odvojeno merio nivo prooksidanasa i antioksidanasa, izvođenje PAB testa omogućava simultano određivanje prooksidanasa i antioksidanasa u datom uzorku, a time i merenje postojeće ravnoteže između njih.

Za izvođenje PAB testa korišćena je metoda Hamidi-Alamdaria i saradnika, uz određene modifikacije. PAB testom se određuje koncentracija vodonik-peroksida (H_2O_2) u antioksidativnom okruženju. Hromogen 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) reaguje i sa vodonik-peroksidom i sa antioksidansima (mokraćnom kiselinom) u isto vreme, obzirom da se nalaze u istoj sredini. Reakcija H_2O_2 je hromogena, enzimski katalizovana enzimom peroksidazom, pri čemu oksidovanjem TMB-a nastaje intenzivno plavo obojeni proizvod. Za razliku od toga reakcija mokraćne kiseline i hromogena je nekatalizovana, hemijska reakcija u kojoj se TMB katjon redukuje do bezbojnog proizvoda. Intenziteti obojenja standardnih rastvora su srazmerni odnosu dodatih količina H_2O_2 i mokraćne kiseline. Kapacitet prisutnih antioksidanasa se kalibriše prema mokraćnoj kiselini i izražava u μmolxL^{-1} mokraćne kiseline, a kapacitet prooksidanasa se kalibriše prema H_2O_2 i izražava u μmolxL^{-1} H_2O_2 . Za pravljenje standardne krive se koriste rastvori H_2O_2 i mokraćne kiseline u različitim odnosima, tako da na početku dominira mokraćna kiselina a na kraju H_2O_2 . Ove dve komponente su izabrane za predstavnike prooksidanasa i antioksidanasa, jer ne reaguju jedna sa drugom i ne ometaju aktivnost jedna drugoj prema hromogenu. Metoda je spektrofotometrijska i apsorpcija se meri na 450 nm na ELISA čitaču. [44]

Produkti uznapredovale oksidacije proteina (AOPP-engl. *advanced oxidation protein products*) predstavljaju oštećenja proteinskih struktura oksidativnim stresom. Ovaj parametar je dobar pokazatelj koliko je došlo do progresije oksidativnog stresa u organizmu, jer proteini, s obzirom na to sa su sami dobro snabdeveni redukujućim grupama, nisu prvi biomolekuli na meti oksidativnog stresa. Kada dođe do značajnijeg oštećenja proteinskih molekula, znači da je proces oksidativnog stresa napredovao i da je osnovna bolest otežena stvaranjem značajnije količine slobodnih radikala i istovremenim

iscrpljivanjem mehanizama antioksidativne zaštite. Ovo je naročito karakteristično za pacijente koji boluju od dijabetesa i bubrežnih bolesti.

Za određivanje AOPP kao markera oksidativnog stresa korišćena je metoda koju su postavili Witko-Sarsat i saradnici. Produkti oksidacije proteina reaguju sa glacijalnom sirćetnom kiselinom i kalijum-jodidom pri čemu formiraju oranž produkte sa apsorpcionim maksimumom na 340 nm. Koncentracija AOPP se izražava preko ekvivalenta hloramina T koji se koristi za izradu standardne krive, u koncentracijama 10-100 $\mu\text{mol/L}$, pri čemu njegova apsorbanca linearno raste sa porastom koncentracije. [44]

Analiza hidrolata koji ulaze u sastav preparata rađena je spregnutim sistemom gasna hromatografija-masena sepektrometrija (GC-MS) na kapilarnoj koloni HP-5MS. (Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu, Zavod za organsku kemiju, Split, Hrvatska)

3.3. Rezultati

U tabeli 2 prikazane su neke od najznačajnijih komponenti četiri hidrolata, koji ulaze u sastav ispitivanog preparata Med(i)ra, kao i njihove vrednosti. Celokupni izveštaji ispitivanja sastava svakog od hidrolata pojedinačno dati su u prilogu. (prilog 1-4)

Tabela 2. Prikaz najznačajnijih komponenti hidrolata biljaka koje ulaze u sastav preparata Med(i)ra

Komponenta	<i>Juniperus oxycedrus</i>	<i>Lavandula angustifolia</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Foeniculum vulgare</i>
	Površina pika %			
1. 1,8-Cineole	0.3	0.2	6.4	5.3
2. Fenchone	0.4	-	-	40.0
3. Linalool	1.4	19.6	2.4	4.6
4. <i>cis</i> -Linalool oxide	-	3.8	0.1	-
5. <i>trans</i> -Linalool oxide	-	3.5	-	-
6. Borneol	1.9	5.8	10.9	-
7. Terpinene-4-ol	2.5	17.0	3.4	3.2
8. <i>p</i> -Cymen-8-ol	3.4	2.2	0.3	0.3
9. α -Terpineol	7.6	13.6	8.3	2.9
10. Verbenone	3.4	0.4	41.8	-
11. <i>trans</i> -Carveol	3.6	0.2	0.2	0.2
12. <i>cis</i> -Carveol	1.4	-	-	-
13. Carvacrol	2.1	-	-	-
14. Methyleugenol	4.3	0.6	1.2	2.3
15. 4-Methyl-2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol	14.8	1.9	2.0	8.8
16. (<i>Z</i>)-9-octadecen-1-ol	2.8	0.3	0.3	7.2
17. Camphor	-	0.7	7.6	1.7
18. Methyl Chavicol (Estragole)	-	-	-	4.4
	-	-	0.3	0.3
19. Geraniol	1.3	0.2	0.6	0.8
20. Eugenol				
21. 3,7-Dimethyloct-1-en-3,7-diol	-	4.0	0.2	-
	-	3.1	-	0.2
22. Coumarin				
Ukupno identifikovano	76.5 %	90.2 %	91.3 %	89.7 %

U sastavu hidrolata primorske kleke (*Juniperus oxycedrus*) se kao najzastupljenije komponente izdvajaju 4-metil-2,6-bis(1,1-dimetiletil)- fenol (14,8%) (koristi se za produkciju BHT) i α -terpineol (7,6%). U hidrolatu lavande (*Lavandula angustifolia*) dominiraju linalool (19,6%), terpinen-4-ol (17,0%) i α -terpineol (13,6%), dok je hidrolat ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*) karakterističan po tome što se kao najznačajnija komponenta posebno izdvaja verbenon (41,8%), a zatim ga slede borneol (10,9%) i α -terpineol (8,3%), ali u znatno manjoj količini u odnosu na verbenon. Glavna komponenta hidrolata komorača (*Foeniculum vulgare*) je fenhon (40%). U sastavu svih hidrolata je prisutan i 1,8-cineol (0,2-6,4%) u većoj ili manjoj meri, kao jedan od značajnijih antioksidanasa.

Rezultati određivanja parametara predstavljeni su numeričkim deskriptivnim veličinama: medijanom (mera centralne tendencije) i interkvartalnim rasponom (25. i 75. percentil), a analiziranje podataka neparametarskim Mann-Whitney U testom. Postojanje statistički značajne razlike prihvatano je za kriterijum p (nivo značajnosti, nivo verovatnoće) $\leq 0,05$. Statistička obrada podataka rađena je u računarskom programu SPSS ver. 26.0 (IBM, Armonk, SAD).

U tabeli 3 prikazani su dobijeni rezultati za merene parametre oksidativnog stresa bez dodatka TBH.

Tabela 3. Rezultati parametara antioksidativnog stresa u uzorcima bez dodatka TBH

	Medi(r)a (c=25%,50%,100%)	Serum	Troloks
TAS ($\mu\text{mol/L}$)	1638.06 ^{a,b} (1597.80-1657.20)	661.99 (628.01-695.97)	809.78 (751.94-867.63)
TOS ($\mu\text{mol/L}$)	124.77 (123.20-130.00)	123.18 (110.64-135.73)	112.77 ^b (109.66-115.68)
PAB (U/L)	3.23 ^{a,b} (2.77-4.23)	97.80 (94.63-100.97)	84.57 (81.63-87.50)
AOPP ($\mu\text{mol/L}$)	90.60 ^{a,b} (90.40-90.60)	118.45 (111.80-125.10)	117.60 (114.20-121.00)
SHG (mmol/l)	1.17 ^{a,b} (0.84-1.73)	0.55 (0.53-0.58)	0.51 (0.50-0.51)
PON1 (U/L)	208.50 ^a (198.00-216.00)	170.00 (164.00-176.00)	183.50 (182.00-185.00)

a - Med(i)ra vs serum; b - Med(i)ra vs troloks; c - serum vs troloks; a,b,c za nivo značajnosti $p < 0,05$ poređeni neparametarskim Mann-Whitney U testom

Med(i)ra je u svim razblaženjima bez dodatka TBH pokazala značajnu statističku razliku u odnosu na uzorke seruma i u odnosu na uzorke sa troloksom za parametre antioksidativne zaštite TAS i SHG, gde su koncentracije oba parametra bile značajno više, dok je koncentracija parametra PAB, koji predstavlja odnos oksidanasa i antioksidanasa u organizmu, bila statistički značajno niža. Takođe, parametar oksidativnog stresa AOPP, bio je statistički značajno niži u uzorcima sa Med(i)rom. Parametar PON1 je u uzorcima sa

Med(i)rom bio statistički značajno viši u odnosu na serum, dok je jedino parametar TOS u uzorcima sa troloksom bio statistički značajno niži u odnosu na uzorke sa Med(i)rom.

U tabeli 4 prikazani su dobijeni rezultati za merene parametre oksidativnog stresa iz uzoraka sa dodatkom TBH.

Tabela 4. Rezultati parametara oksidativnog stresa u uzorcima sa dodatkom TBH

	Medi(r)a (c=25%,50%,100%) sa dodatkom TBH	Serum sa dodatkom TBH	Troloks sa dodatkom TBH
TAS ($\mu\text{mol/L}$)	1604.86 ^{d,e} (1583.94-1642.47)	733.78 (711.68-755.87)	751.74 (732.69-770.80)
TOS ($\mu\text{mol/L}$)	126.83 (124.75-128.01)	128.65 (127.24-130.07)	125.65 (123.73-127.58)
PAB (U/L)	2.30 ^{d,e} (1.97-3.10)	113.10 (112.23-113.97)	96.03 (95.43-96.63)
AOPP ($\mu\text{mol/L}$)	109.30 (90.80-129.00)	121.95 (120.70-123.20)	119.90 (115.30-124.50)
SHG (mmol/l)	0.77 ^{d,e} (0.64-0.98)	0.47 (0.46-0.48)	0.48 (0.44-0.52)
PON1 (U/L)	195.00 (169.00-213.00)	217.50 (188.00-247.00)	196.50 (194.00-199.00)

d - Med(i)ra sa dodatkom TBH vs serum sa dodatkom TBH; *e* - Med(i)ra sa dodatkom TBH vs troloks sa dodatkom TBH; *f* - serum sa dodatkom TBH vs troloks sa dodatkom TBH; *d,e,f*-za nivo značajnosti $p < 0,05$

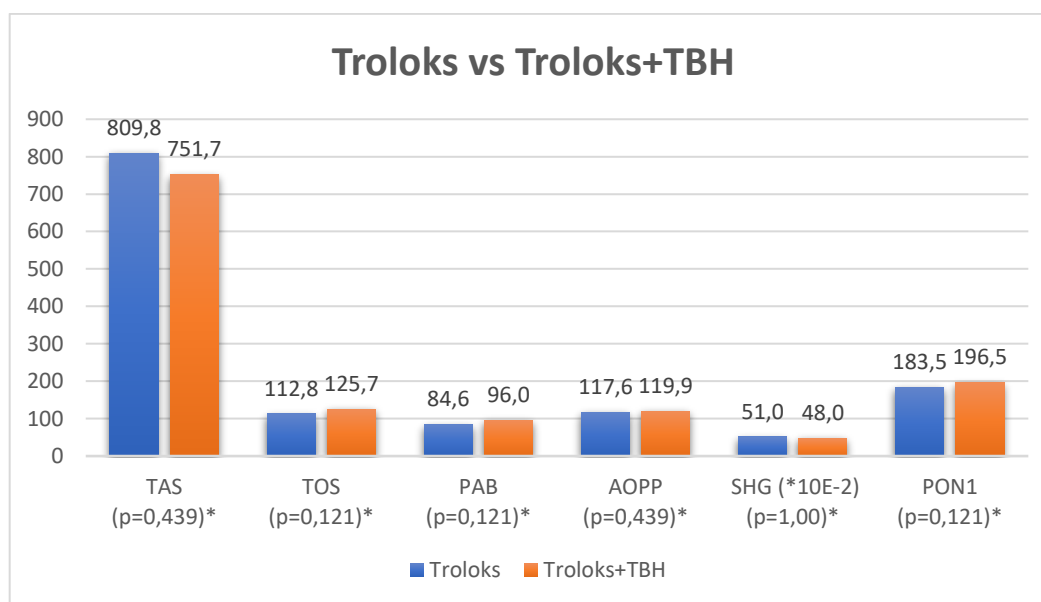
Sa dodatkom TBH uočava se da su se uzorci sa Med(i)rom značajno statistički razlikovali za parametre antioksidativne zaštite TAS, SHG (imali su značajno više koncentracije u uzorcima sa Med(i)rom) i parametar odnosa oksidativnog i antioksidativnog statusa PAB (imao je značajno nižu koncentraciju u uzorcima sa Med(i)rom) i u odnosu na serum sa dodatkom TBH i u odnosu na troloks u prisustvu TBH. Kod dobijenih vrednosti za parametre TOS, AOPP i PON1 nije uočena značajna statistička razlika. Takođe, uočeno je da troloks sa dodatkom TBH nije pokazao statistički značajnu razliku u odnosu na serum sa dodatkom TBH ni za jedan od merenih parametara.

Rezultati dobijeni za parametre oksidativnog statusa u uzorcima sa Med(i)rom bez i u prisustvu TBH dati su u tabeli 5.

Tabela 5. Rezultati parametara oksidativnog stresa u uzorcima sa Med(i)rom bez i sa dodatkom TBH

	Medi(r)a (c=25%,50%,100%)	Medi(r)a (c=25%,50%,100%) sa dodatkom TBH	<i>p</i>
TAS ($\mu\text{mol/L}$)	1638.06 (1597.80-1657.20)	1604.86 (1583.94-1642.47)	<i>p</i> =0,748
TOS ($\mu\text{mol/L}$)	124.77 (123.20-130.00)	126.83 (124.75-128.01)	<i>p</i> =0,522
PAB (U/L)	3.23 (2.77-4.23)	2.30 (1.97-3.10)	<i>p</i> =0,054
AOPP ($\mu\text{mol/L}$)	90.60 (90.40-90.60)	109.30 (90.80-129.00)	<i>p</i> <0,05
SHG (mmol/l)	1.17 (0.84-1.73)	0.77 (0.64-0.98)	<i>p</i> <0,05
PON1 (U/L)	208.50 (198.00-216.00)	195.00 (169.00-213.00)	<i>p</i> =0,262

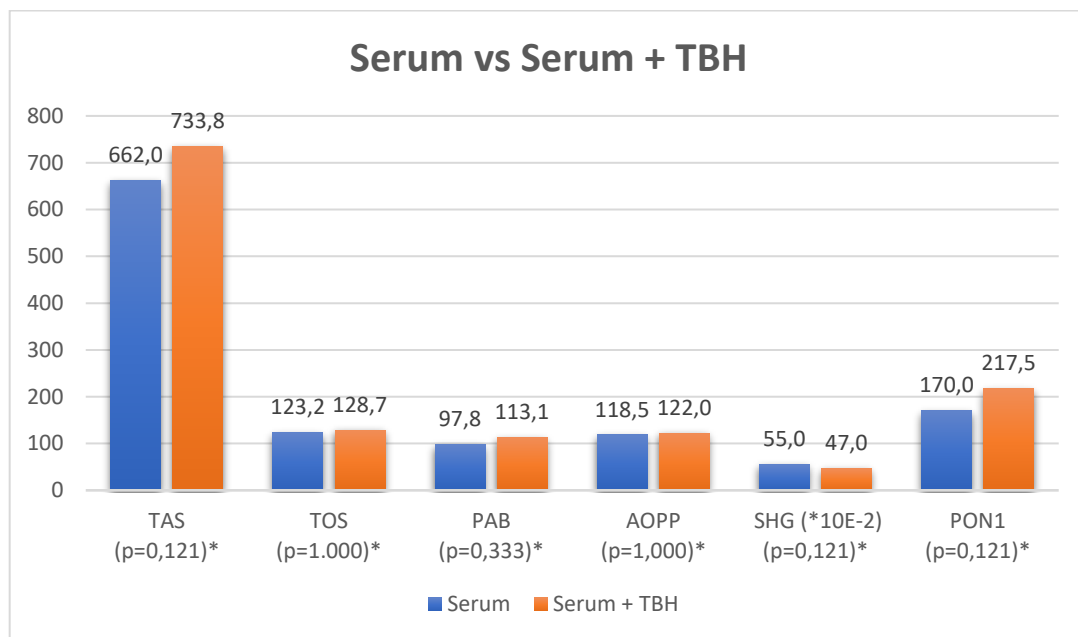
Kada se porede rezultati dobijeni za parametre oksidativnog stresa za uzorke u koje je dodata Med(i)ra kao antioksidans bez prisustva TBH u odnosu na rezultate parametara za uzorke u koje je pored Med(i)re dodat i TBH, uočava se da je statistički značajna razlika postojala samo za parametre SHG, gde je vrednost parametra bila značajno niža u prisustvu TBH, i za AOPP čija je vrednost bila značajno viša u prisustvu TBH. Rezultati poređenja rezultata dobijenih bez dodatka TBH, kao i u njegovom prisustvu za uzorke seruma i za uzorke sa troloksom, predstavljeni su grafički (slike 11 i 12).



*Na grafiku su prikazane *p* vrednosti za svaki od parametar dobijene poređenjem medijana neparametarskim Mann-Whitney U testom

Slika 11. Grafik dobijenih vrednosti za parametre oksidativnog stresa u uzorcima sa troloksom bez i sa dodatkom TBH

Iz rezultata merenja vrednosti za parametre oksidativnog stresa u uzorcima sa troloksom, bez i sa dodatkom TBH, uočljivo je da je dodatkom TBH došlo do pada u koncentraciji TAS, kao i do porasta koncentracije TOS i PAB, ali ove promene koncentracija se nisu pokazale kao statistički značajne. Takođe, poređenjem rezultata parametara dobijenih iz uzoraka seruma, nijedan od merenih parametara nije pokazao statistički značajne promene u koncentraciji nakon dodatka TBH (slika 12).



*Na grafiku su prikazane p vrednosti za svaki od parametara dobijene poređenjem medijana neparametarskim Mann-Whitney U testom

Slika 12. Grafik dobijenih vrednosti za parametre oksidativnog stresa u uzorcima seruma bez i sa dodatkom TBH

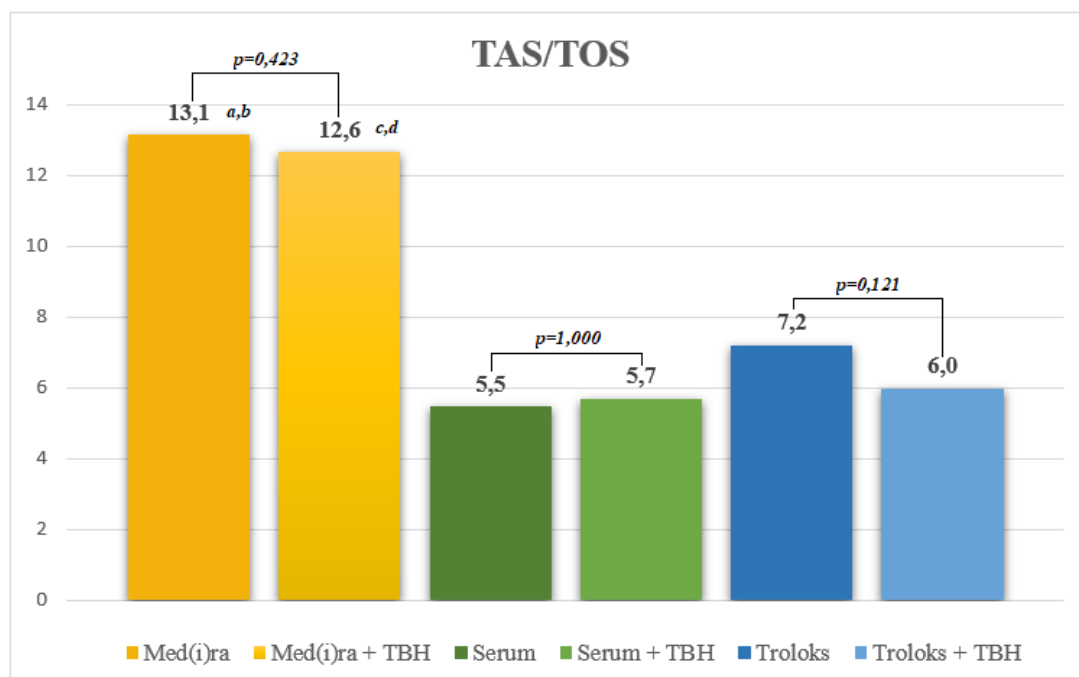
Upoređivanjem rezultata Med(i)re sa dodatkom TBH uočeno je da je za određene parametre, Med(i)ra i pored dodatka TBH pokazala značajnu statističku razliku, odnosno povoljniji redoks status u serumu. Rezultati poređenja su prikazani u tabeli 6.

Tabela 6. Poređenje Med(i)re u prisustvu TBH i troloksa bez dodatka TBH

	Medi(r)a (c=25%,50%,100%) sa dodatkom TBH	Troloks	p
TAS ($\mu\text{mol/L}$)	1604.86 (1583.94-1642.47)	809.78 (751.94-867.63)	<0,05
TOS ($\mu\text{mol/L}$)	126.83 (124.75-128.01)	112.77 (109.66-115.68)	<0,05
PAB (U/L)	2.30 (1.97-3.10)	84.57 (81.63-87.50)	<0,05
AOPP ($\mu\text{mol/L}$)	109.30 (90.80-129.00)	117.60 (114.20-121.00)	1,00
SHG (mmol/l)	0.77 (0.64-0.98)	0.51 (0.50-0.51)	<0,05
PON1 (U/L)	195.00 (169.00-213.00)	183.50 (182.00-185.00)	0,505

Od svih ispitivanih parametara, jedino PON1 i AOPP nisu pokazali statistički značajnu razliku kada se porede rezultati iz uzoraka sa Med(i)rom u prisustvu TBH i troloksa bez prisustva TBH. Treba istaći da od svih rezultata koji su pokazali statistički značajnu razliku (TAS, PAB, SHG, TOS), rezultat za TOS se statistički značajno razlikovao u korist troloksa tj. bio je niži kada je u serum dodat troloks, dok su se TAS, PAB i SHG statistički značajno razlikovali u korist Med(i)re, odnosno TAS i SHG su pokazali značajno više koncentracije u uzorcima u koje je dodata Med(i)ra, dok su koncentracije za PAB bile značajno niže u uzorcima u koje je dodata Med(i)ra.

Kako bi se bolje predstavio odnos antioksidativne zaštite organizma i oksidativnog stresa, na slici 13 predstavljen je odnos TAS/TOS, koji predstavlja kvantitativnu meru odnosa antioksidativnih redukujućih supstanci i oksidujućih supstanci u serumu, za sve ispitivane grupe.



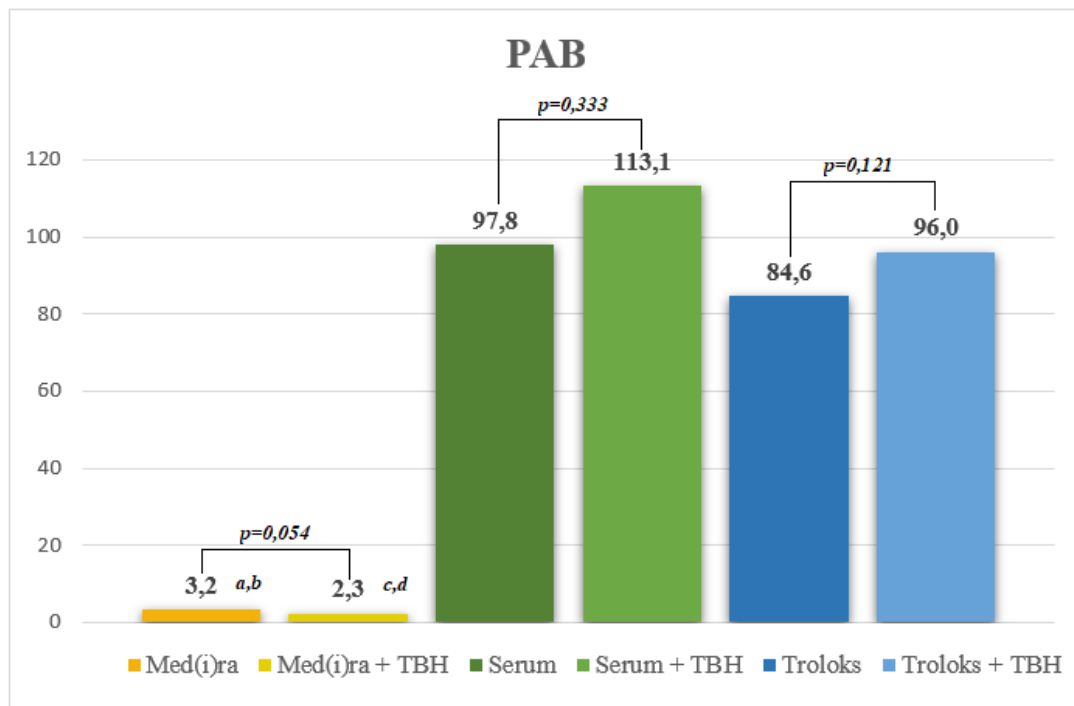
*p vrednosti između istih grupa bez i sa dodatkom TBH prikazane su na samom grafiku; a - Med(i)ra vs serum; b - Med(i)ra vs troloks; c-Med(i)ra sa dodatkom TBH vs serum sa dodatkom TBH; d - Med(i)ra sa dodatkom TBH vs troloks sa dodatkom TBH; a,b,c,d -za nivo značajnosti $p < 0,05$; p vrednosti su dobijene poređenjem medijana neparametarskim Mann-Whitney U testom

Slika 13. Grafik odnosa rezultata TAS/TOS za sve ispitivane grupe

Ako se porede rezultati odnosa TAS/TOS dobijeni iz istih uzoraka bez i sa dodatkom TBH, može se zaključiti da ne postoje značajne razlike u istim uzorcima nakon dodatka TBH. Međutim, iz rezultata prikazanih na grafiku, jasno je uočljivo da je odnos TAS/TOS značajno veći u uzorcima sa Med(i)rom, bez obzira da li je u uzorke dodat TBH ili nije, što pokazuje i dobijena p vrednost koja pokazuje statističku značajnost ($p < 0,05$) u

poređenju uzoraka Med(i)re, bez i sa dodatkom TBH, u odnosu na serum, serum sa dodatkom TBH, kao i u odnosu na troloks, bez i sa dodatkom TBH.

Drugi parametar koji direktnim merenjem omogućava određivanje prooksidanasa i antioksidanasa u datom uzorku, a time i merenje postojeće ravnoteže između njih je PAB. Na slici 14 prikazani su rezultati merenja PAB za sve ispitivane grupe uzoraka.



**p* vrednosti između istih grupa, bez i sa dodatkom TBH, prikazane su na samom grafiku; a - Med(i)ra vs serum; b - Med(i)ra vs troloks; c - Med(i)ra sa dodatkom TBH vs serum sa dodatkom TBH; d - Med(i)ra sa dodatkom TBH vs troloks sa dodatkom TBH; a,b,c,d - za nivo značajnosti $p < 0,05$; *p* vrednosti su dobijene poređenjem medijana neparametarskim Mann-Whitney U testom

Slika 14. Grafik rezultata merenja PAB za sve ispitivane grupe uzoraka

Jasno je da su vrednosti dobijene za PAB iz uzoraka sa Med(i)rom u poređenju sa serumom i troloksom, kao i sa serumom i troloksom u prisustvu TBH, pokazali značajnu statističku razliku ($p < 0,05$), tj. bile su značajno niže. Iako je na grafiku uočljiva razlika u vrednostima PAB između seruma (seruma sa TBH) i troloksa (troloksa sa TBH), ne postoji značajna statistička razlika u poređenju ovih grupa uzoraka. Takođe, ne postoji ni značajna razlika u vrednostima dobijenim iz istih uzoraka bez i sa dodatkom TBH.

U prilogu (prilog 5) su date vrednosti medijana sa interkvartalnim rasponom (25. i 75. percentil) za sve grupe uzoraka i sve merene parametre, kao i tabele *p*-vrednosti dobijene poređenjem svih grupa za svaki od merenih parametara (prilog 6).

3.4. Diskusija

Kako je oksidativni stres uključen u patogenezu mnogih oboljenja, i kako su se sintetski antioksidansi, poput butil hidroksitoluena (BHT) i butil hidroksianizola (BHA), pokazali kao potencijalno štetni po zdravlje ljudi, istraživanja se sve više usmeravaju ka pronalaženju efikasnih antioksidanasa koji potiču iz biljaka i drugih prirodnih izvora, kao što je med. BHT i BHA su sintetski antioksidansi, koji se i dalje koriste u industriji hrane, kao aditivi u proizvodnji jestivih rafiniranih biljnih ulja u određenim dozvoljenim koncentracijama, ali su povučeni iz farmakološke upotrebe zbog kancerogenog potencijala, koji se ispoljavao pri visokim dozama i dugotrajnoj upotrebi. Sa druge strane, prirodni antioksidansi (vitamin C, E, karotenoidi, koenzim Q i dr.) pokazuju manje štetnih efekata, dok njihov antioksidativni efekat može biti i veći u odnosu na navedene sintetske antioksidanse. Iz tih razloga sve je veća težnja ka uvođenju prirodnih antioksidanasa, i kao aditiva u hrani, i kao dijetetskih suplemenata, koji imaju za cilj da smanje oksidativno oštećenje ćelija i umanje rizik od nastanka hroničnih bolesti izazvanih oksidativnim stresom. [16], [46] Osim biljaka, bogati izvor prirodnih antioksidanasa predstavlja i med, koji je bogat flavonoidima i fenolnim kiselinama, vitaminom C, vitaminom E, enzimima, kao što su katalaza i peroksidaza, i elementima u tragu. [6]

Cilj rada je bio da se ispita antioksidativno delovanje preparata koji se sastoji iz biljnih kompleksa (hidrolata) različitog aromatičnog bilja, čije glavne komponente uglavnom čine terpeni i terpenoidi, dodatka ruzmarinske kiseline, kao fenolne kiseline koja poseduje antioksidativne osobine i meda, kao prirodnog proizvoda koji je takođe bogat polifenolnim jedinjenjima, koja poseduju antioksidativne osobine.

Parametri TAS i SHG ukazuju na potencijal antioksidativne zaštite u odnosu na prisustvo oksidanasa u uzorku, dok PAB ukazuje na ravnotežu prooksidanasa i antioksidanasa u organizmu. Iz dobijenih rezultata, uočava se da se rezultati merenja za TAS, SHG i PAB u uzorcima u koje je dodata Med(i)ra značajno statistički razlikuju u odnosu na merenja iz uzoraka seruma i uzoraka u koji je dodat troloks, koji takođe ima antioksidativno delovanje, pri čemu su vrednosti za TAS i SHG bili značajno viši u uzorcima sa Med(i)rom, dok je PAB u tim uzorcima bio značajno niži. Značajna statistička razlika postojala je i za merenja za iste parametre čak i kada je u uzorke sa Med(i)rom dodat TBH, kao oksidans, odnosno, TAS i SHG su i dalje bili u značajno višim koncentracijama, dok je PAB i dalje bio značajno niži u odnosu na uzroke seruma i troloksa u prisustvu TBH. Ovo ukazuje da je Med(i)ra i pored dodatka oksidansa zadržala antioksidativnu zaštitu na visokom nivou. *In vitro* istraživanje u kome je ispitivana antioksidativna aktivnost hidrolata osam biljnih vrsta, bez i sa dodatkom TBH, kao oksidansa, među kojima su se ispitivali i hidrolati koji ulaze u sastav Med(i)re (ruzmarin, primorska kleka, komorač i lavanda), pokazalo je da sami hidrolati nisu značajno promenili koncentraciju antioksidativnog parametra TAS bez dodatka TBH, ali su hidrolat ruzmarina i primorske kleke značajno snizili koncentracije TOS. Dodatkom TBH hidrolat lavande je pokazao značajno višu koncentraciju TAS, i u odnosu na hidrolat komorača, i u odnosu na hidrolat primorske kleke. Prilikom dodatka TBH vrednosti TOS bile su značajno niže u odnosu na serum u uzorcima u koje je dodat hidrolat lavande, zbog čega je i odnos TAS/TOS bio viši u ovim uzorcima. Takođe, antioksidativni parametar, odnos TAS/TOS bio je značajno viši u uzorcima sa hidrolatom lavande u odnosu na uzorke sa dodatkom primorske kleke.

Hidrolat ruzmarina osim što je doveo do značajnog pada u koncentraciji TOS, značajno je snizio i koncentraciju AOPP u odnosu na serum. Iz svega navedenog došlo se do zaključka da hidrolati ruzmarina, primorske kleke, lavande i komorača imaju značajan antioksidativni potencijal. [47] Druga studija je pokazala sposobnost hidrolata ruzmarina kao „hvatača“ hidroksil radikala, dok se hidrolat lavande pokazao kao dobar „hvatač“ superoksidnog anjona. [26] Ovo ukazuje da uticaj Med(i)re na navedene parametre većim delom potiče od ruzmarinske kiseline, koja je pokazala svoje antioksidativne sposobnosti u više sprovedenih studija, uključujući i studiju koja je ispitala antiapoptotičko i antioksidativno delovanje RA na astrocitima [48], kao i studiju koja se bavila delovanjem RA na vodonik-peroksid indukovanoj apoptozi nervnih ćelija. [49] Istraživanje koje je sprovedeno na poređenju antioksidativne aktivnosti hidrolata i hidrolata u koje je dodata RA pokazalo je statistički značajne više vrednosti dobijene za antioksidativni parametar, TAS/TOS odnos, što ukazuje na to da RA značajno poboljšava antioksidativni efekat hidrolata. [50]

Osim što je dodatak Med(i)re u uzorke bez TBH značajno povisio koncentracije za parametre TAS i SHG, i snizio koncentraciju PAB, takođe je i značajno povisio koncentraciju PON1 i doveo do značajnog pada koncentracije AOPP u odnosu na vrednosti ovih parametara dobijenih iz merenja uzoraka u koje je dodat troloks ili uzoraka seruma. U *in vivo* istraživanju sprovedenim na estrogen deficitarnim pacovima, RA je takođe pokazala statistički značajan pad koncentracije AOPP. Pretpostavlja se da RA dovodi do pada AOPP delovanjem na mijeloperoksidazu, koja katalizuje reakciju između hloridnog jona i vodonik-peroksida, u kojoj dolazi do stvaranja hipohloraste kiseline. Hipohlorasta kiselina je jedan od faktora koji vodi ka produkciji AOPP.[51] Međutim, dodatkom TBH, vrednosti za AOPP i PON1 su i dalje bile niže u odnosu na vrednosti ovih parametara iz uzoraka seruma i uzoraka sa troloksom u koje je takođe dodat TBH, ali bez statistički značajne razlike (tabela 4). Sve ovo ukazuje na to da Med(i)ra može povećati aktivnost antioksidativnog enzima PON1, kao i da smanji oksidaciju proteina u određenim uslovima. Studija koja se bavila efektom peroksinitrita na oštećenje memorije indukovane amiloidnim beta proteinom (A β) je pokazala RA deluje kao „hvatač“ na peroksinitrit i time dovodi do smanjenog oštećenja proteina izazvanih nitrizacijom proteina. [52]

U ovom istraživanju, Med(i)ra je pokazala značajno više vrednosti za parametre antioksidativne zaštite TAS i SHG i značajno niže za PAB u odnosu na troloks, čak i kada se porede rezultati uzoraka u koje je uz Med(i)ru dodat i TBH u odnosu na rezultate uzoraka sa troloksom bez dodatka TBH, dok je troloks pokazao bolji efekat na pad koncentracije TOS (tabela 5). U različitim studijama, RA je takođe pokazala bolju antioksidativnu efikasnost u odnosu na troloks i druge oblike vitamina E, kao što je γ -tokoferol. Ipak, najbolji antioksidativni efekat je postignut sinergističkim delovanjem ruzmarinske kiseline i vitamina E, koji se najverovatnije postiže tako što ruzmarinska kiselina smanjuje njegovu oksidaciju, a ne dovodi do njegove regeneracije, za razliku od drugih antioksidanasa koji deluju sinergistički sa vitaminom E. [53], [54] Kada se poredi efekat same Med(i)re bez dodatka i sa dodatkom TBH, uočava se da dodavanjem TBH nije došlo do statistički značajnih promena u koncentracijama TAS, TOS i PAB, kao ni u odnosu TAS/TOS, što ukazuje na to da je i uz dodatak TBH Med(i)ra zadržala svoj antioksidativni potencijal. Dodatkom TBH u uzorke sa Med(i)rom u odnosu na uzorke bez TBH, jedino je koncentracija SHG značajno opala, dok se koncentracija AOPP značajno povećala. Međutim, i pored značajnog pada koncentracije SHG nakon dodatka TBH, ta

koncentracija je i dalje bila značajno viša u odnosu na koncentracije SHG u uzorcima seruma i troloksa sa dodatkom TBH. Osim studija koje su pokazale antioksidativno delovanje hidrolata i ruzmarinske kiseline, i med je u studiji izvedenoj na endotelnim ćelijama pokazao značajnu antioksidativnu aktivnost u prisustvu različitih prooksidanasa, posebno delujući protektivno na GSH, kao i vršeci regeneraciju GSH iz GSSG, što je najverovatnije posledica delovanja lipofilnih komponenata meda. [55]

3.5. Zaključak

Kako oksidativni stres može biti jedan od glavnih uzročnika mnogih oboljenja, jasno je da je povećanje antioksidativne zaštite organizma jedan od prvih i ključnih koraka u borbi protiv razvoja tih oboljenja. Novija istraživanja su pokazala da prirodni antioksidansi mnogo povoljnije utiču na zdravlje ljudi usled veće efikasnosti antioksidativnog delovanja, a posebno usled smanjenog toksičnog delovanja na ljudski organizam, zbog čega sve više nalaze primenu u svakodnevnoj ishrani kao funkcionalna hrana ili napici.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je preparat Medi(i)ra značajno povećao koncentracije parametara, pre svega antioksidativne zaštite TAS i SHG, kao i smanjio koncentraciju parametra prooksidativnog-antioksidativnog balansa (PAB), dok je doveo do značajnog povećanja odnosa TAS/TOS, čak i u prisustvu oksidansa TBH. Takođe, efikasno je delovao i na parametre PON1 i AOPP, čime se pokazao kao efikasno sredstvo u antioksidativnoj zaštiti u ovom *in vitro* ispitivanju.

Kako je ruzmarinska kiselina, fenolna kiselina sa jakim antioksidativnim delovanjem, može se zaključiti da antioksidativne sposobnosti preparata u najvećoj meri potiču upravo od različitih antioksidativnih mehanizama same ruzmarinske kiseline. Međutim, ne treba zanemariti ni antioksidativno delovanje različitih terpenoidnih jedinjenja koji potiču iz četiri različita hidrolata (ruzmarina, lavande, komorača i primorske kleke), kao ni antioksidativnu aktivnost meda, koji je bogat različitim polifenolnim jedinjenjima i koji je u ovoj kombinaciji sastojaka preparata posebno značajan zbog svojih lipofilnih komponenti, čiji se antioksidativni mehanizmi delovanja mogu razlikovati od antioksidativnih mehanizama delovanja hidrofilnih komponenti. Iz svega navedenog, jasno je da je sinergističko delovanje svih antioksidativnih komponenti preparata (hidrolata, ruzmarinske kiseline i meda), ključno u postizanju antioksidativnog efekta.

Iako je preparat pokazao značajni antioksidativni efekat u *in vitro* ispitivanju, potrebno je sprovesti i dalja ispitivanja, posebno *in vivo*, pre svega zbog same kompleksnosti u sastavu preparata, kao i metaboličkih promena komponenti do kojih dolazi *in vivo* primenom preparata.

4. Literatura:

- [1] J. Stanković, Univerzitet u Nišu, Prorodno matematički fakultet, department za hemiju, "Master rad Određivanje antioksidativnih karakteristika odabranih vrsta lubenica i dinja," 2019.
- [2] A. Vitković, Univerzitet u Nišu, Prorodno matematički fakultet, department za hemiju, "Određivanje antioksidativnih karakteristika odabranih gljiva roda *Lactarius*," 2017.
- [3] R. Singh, S. Devi, and R. Gollen, "Role of free radical in atherosclerosis, diabetes and dyslipidaemia: Larger-than-life," *Diabetes. Metab. Res. Rev.*, vol. 31, no. 2, pp. 113–126, 2015, doi: 10.1002/dmrr.2558.
- [4] V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, and N. Chandra, "Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health," *Pharmacogn. Rev.*, vol. 4, no. 8, pp. 118–126, 2010, doi: 10.4103/0973-7847.70902.
- [5] K. Carović-Stanko *et al.*, "Medicinal plants of the family lamiaceae as functional foods-A review," *Czech J. Food Sci.*, vol. 34, no. 5, pp. 377–390, 2016, doi: 10.17221/504/2015-CJFS.
- [6] M. Dzugan, M. Tomczyk, P. Sowa, and D. Grabek-Lejko, "Antioxidant activity as biomarker of honey variety," *Molecules*, vol. 23, no. 8, pp. 1–14, 2018, doi: 10.3390/molecules23082069.
- [7] J. Gradašćević - Gubaljević, "Slobodni radikali, antioksidansi i oksidativni stres [internet]; c2019 [cited 2019 Dec 15]. Available from: <https://modroizeleno.com/naucna-medicina/slobodni-radikali-antioksidansi-i-oksidativni-stres/>," 2019. .
- [8] A. Phaniendra, D. B. Jestadi, and L. Periyasamy, "Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases," *Indian J. Clin. Biochem.*, vol. 30, no. 1, pp. 11–26, 2015, doi: 10.1007/s12291-014-0446-0.
- [9] L. A. Pham-Huy, H. He, and C. Pham-Huy, "Free radicals, antioxidants in disease and health," *Int. J. Biomed. Sci.*, vol. 4, no. 2, pp. 89–96, 2008.
- [10] S. Di Meo, T. T. Reed, P. Venditti, and V. M. Victor, "Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/1245049.
- [11] P. Rad, R. Paper, J. Stevanovi, S. Borozan, S. Jovi, and I. Ignjatovi, "Fiziologija slobodnih radikala *," pp. 95–107, 2010.

- [12] A. Ayala, M. F. Muñoz, and S. Argüelles, "Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/360438.
- [13] L. Štefan, T. Tepšić, T. Zavidčić, M. Urukalo, D. Tota, and R. Domitrović, "Lipidna peroksidacija - Uzroci i posljedice," *Medicina (B. Aires)*, vol. 43, no. 2, pp. 84–93, 2007.
- [14] O. M. Ighodaro and O. A. Akinloye, "First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid," *Alexandria J. Med.*, vol. 54, no. 4, pp. 287–293, 2018, doi: 10.1016/j.ajme.2017.09.001.
- [15] E. Ginter, V. Simko, and V. Panakova, "Antioxidants in health and disease," *Bratislava Med. J.*, vol. 115, no. 10, pp. 603–606, 2014, doi: 10.4149/BLL_2014_116.
- [16] J. M. Lü, P. H. Lin, Q. Yao, and C. Chen, "Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 14, no. 4, pp. 840–860, 2010, doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x.
- [17] K. B. Pandey and S. I. Rizvi, "Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2, no. 5, pp. 270–278, 2009, doi: 10.4161/oxim.2.5.9498.
- [18] L. A. de la Rosa, J. O. Moreno-Escamilla, J. Rodrigo-García, and E. Alvarez-Parrilla, *Phenolic Compounds*. Elsevier Inc., 2019.
- [19] M. Vinčić, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, doktorska disertacija, "Antioksidativna, antiproliferativna i antimikrobna aktivnost odabranih ekstrakata tropova bobičastog voća," 2017.
- [20] V. Krimer Malešević, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, doktorska dizertacija, "Fenolni potencijal uljanih pogača," 2016.
- [21] T. Friedman, "The Effect of Rosmarinic Acid on Immunological and Neurological Systems: A Basic Science and Clinical Review," *J. Restor. Med.*, vol. 4, no. 1, pp. 50–59, 2016, doi: 10.14200/jrm.2015.4.0105.
- [22] T. Hussain, B. Tan, Y. Yin, F. Blachier, M. C. B. Tossou, and N. Rahu, "Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/7432797.
- [23] S. D. Tetali, "Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use," *Planta*, vol. 249, no. 1, 2019, doi: 10.1007/s00425-018-3056-x.
- [24] Z. S and B. C, "Plant terpenoids: applications and future potentials," *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 3, no. February, pp. 1–7, 2008.

- [25] E. Gonzalez-Burgos and M. P. Gomez-Serranillos, "Terpene Compounds in Nature: A Review of Their Potential Antioxidant Activity," *Curr. Med. Chem.*, vol. 19, no. 31, pp. 5319–5341, 2012, doi: 10.2174/092986712803833335.
- [26] Smail Aazza, "Antioxidant activity of some Moroccan hydrosols," *J. Med. Plants Res.*, vol. 5, no. 30, pp. 6688–6696, 2011, doi: 10.5897/jmpr11.1176.
- [27] S. M. Schorr, "Bioresonance and Phytotherapeutic Hydrosols in Healing," pp. 1–20, 2004.
- [28] B. R. R. Rao, "Hydrosols and water-soluble essential oils of aromatic plants : Future economic products," *Indian Perfum.*, vol. 56, no. 3, pp. 29–33, 2012.
- [29] A. Hamed, S. M. Moheimani, A. Sakhteman, H. Etemadfar, and M. Moein, "An Overview on Indications and Chemical Composition of Aromatic Waters (Hydrosols) as Functional Beverages in Persian Nutrition Culture and Folk Medicine for Hyperlipidemia and Cardiovascular Conditions," *J. Evidence-Based Complement. Altern. Med.*, vol. 22, no. 4, pp. 544–561, 2017, doi: 10.1177/2156587216686460.
- [30] K. Tomi, M. Kitao, N. Konishi, H. Murakami, Y. Matsumura, and T. Hayashi, "Enantioselective GC-MS analysis of volatile components from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oils and hydrosols," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 80, no. 5, pp. 840–847, 2016, doi: 10.1080/09168451.2016.1146066.
- [31] R. Prusinowska, K. Ąmigielski, A. Stobiecka, and A. Kunicka-Styczyńska, "Hydrolates from lavender (*Lavandula angustifolia*) - Their chemical composition as well as aromatic, antimicrobial and antioxidant properties," *Nat. Prod. Res.*, vol. 30, no. 4, pp. 386–393, 2016, doi: 10.1080/14786419.2015.1016939.
- [32] M. Shekarchi, H. Hajimehdipoor, S. Saeidnia, A. R. Gohari, and M. P. Hamedani, "Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family," *Pharmacogn. Mag.*, vol. 8, no. 29, pp. 37–41, 2012, doi: 10.4103/0973-1296.93316.
- [33] M. Petersen and M. S. J. Simmonds, "Rosmarinic acid," *Phytochemistry*, vol. 62, no. 2, pp. 121–125, 2003, doi: 10.1016/S0031-9422(02)00513-7.
- [34] J. Youn *et al.*, "Beneficial effects of rosmarinic acid on suppression of collagen induced arthritis," *J. Rheumatol.*, vol. 30, no. 6, pp. 1203–1207, 2003.
- [35] V. Savić, Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet, doktorska dizertacija, "HEMIJSKI SASTAV I FARMAKOLOŠKE AKTIVNOSTI VODENOG EKSTRAKTA KORENA GAVEZA (*SYMPHYTUM OFFICINALE* L.)," 2015.
- [36] H. Cao, W. X. Cheng, C. Li, X. L. Pan, X. G. Xie, and T. H. Li, "DFT study on the antioxidant activity of rosmarinic acid," *J. Mol. Struct. THEOCHEM*, vol. 719, no. 1–3, pp. 177–183, 2005, doi: 10.1016/j.theochem.2005.01.029.

- [37] M. G. Battelli, L. Polito, M. Bortolotti, and A. Bolognesi, "Xanthine oxidoreductase-derived reactive species: Physiological and pathological effects," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/3527579.
- [38] O. Fadel, K. El Kirat, and S. Morandat, "The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1808, no. 12, pp. 2973–2980, 2011, doi: 10.1016/j.bbamem.2011.08.011.
- [39] X. Cai, F. Yang, L. Zhu, Y. Xia, Q. Wu, and H. Xue, "molecules Rosmarinic Acid , the Main Effective Constituent of Orthosiphon stamineus , Inhibits Intestinal Epithelial."
- [40] J. P. Silva, A. C. Gomes, and O. P. Coutinho, "Oxidative DNA damage protection and repair by polyphenolic compounds in PC12 cells," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 601, no. 1–3, pp. 50–60, 2008, doi: 10.1016/j.ejphar.2008.10.046.
- [41] Ministar poljoprivrede i zaštite životne sredine "Službeni glasnik RS", broj 101 od 8. decembra 2015. Na osnovu člana 55. stav 2. Zakona o bezbednosti hrane („Službeni glasnik RS”, broj 41/09), "PRAVILNIK o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela," pp. 1–6, 2015.
- [42] V. Baltrušaityte, P. R. Venskutonis, and V. Čeksteryte, "Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts," *Food Chem.*, vol. 101, no. 2, pp. 502–514, 2007, doi: 10.1016/j.foodchem.2006.02.007.
- [43] S. Aazza, B. Lyoussi, D. Antunes, and M. G. Miguel, "Physicochemical characterization and antioxidant activity of 17 commercial Moroccan honeys," *Int. J. Food Sci. Nutr.*, vol. 65, no. 4, pp. 449–457, 2014, doi: 10.3109/09637486.2013.873888.
- [44] J. Kotur-Stevuljević, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakulete, Katedra za medicinsku biohemiju, "METODE ZA ODREĐIVANJE PARAMETARA OKSIDATIVNOG STRESA I ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE." .
- [45] D. Č. Ardalić, "Pokazatelji oksidativnog stresa, lipidni profil i status enzima paraoksonaza 1 tokom trudnoće bez komplikacija i nakon porođaja," *Univ. u Beogradu*, 2014.
- [46] M. Rico, I. Sánchez, C. Trujillo, and N. Pérez, "Screening of the antioxidant properties of crude extracts of six selected plant species from the Canary Islands (Spain)," *J. Appl. Bot. Food Qual.*, vol. 86, no. 1, pp. 217–220, 2013, doi: 10.5073/JABFQ.2013.086.030.
- [47] M. Stanić, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakulete, Katedra za medicinsku biohemiju, diplomski rad, "Ispitivanje in vitro antioksidativne aktivnosti hidrolata različitih biljnih vrsta u biološkom materijalu." .

- [48] L. P. Gao, H. L. Wei, H. S. Zhao, S. Y. Xiao, and R. L. Zheng, “Antiapoptotic and antioxidant effects of rosmarinic acid in astrocytes,” *Pharmazie*, vol. 60, no. 1, pp. 62–65, 2005.
- [49] H. J. Lee *et al.*, “Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis,” *Toxicology*, vol. 250, no. 2–3, pp. 109–115, 2008, doi: 10.1016/j.tox.2008.06.010.
- [50] Antonić T, Vujčić S., Miljak-Vujičić G., Kotur-Stevuljević J., Stojanović D., Miljak M. (2018): Antioxidant potential of different hydrolate mixtures, Serbian Society for Mitochondrial and Free Radical Physiology, September 28-30, Belgrade Serbia
- [51] M. Zych, I. Kaczmarczyk-Sedlak, W. Wojnar, and J. Folwarczna, “Effect of rosmarinic acid on the serum parameters of glucose and lipid metabolism and oxidative stress in estrogen-deficient rats,” *Nutrients*, vol. 11, no. 2, 2019, doi: 10.3390/nu11020267.
- [52] T. Alkam, A. Nitta, H. Mizoguchi, A. Itoh, and T. Nabeshima, “A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by A β 25-35,” *Behav. Brain Res.*, vol. 180, no. 2, pp. 139–145, 2007, doi: 10.1016/j.bbr.2007.03.001.
- [53] A. Panya, “Strategies to Improve the Performance of Antioxidants in Oil-in-Water Emulsions,” pp. 1–187, 2012.
- [54] M. E. Cuvelier, H. Richard, and C. Berset, “Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary,” *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 73, no. 5, pp. 645–652, 1996, doi: 10.1007/BF02518121.
- [55] G. Beretta, M. Orioli, and R. M. Facino, “Antioxidant and radical scavenging activity of honey in endothelial cell cultures (EA.hy926),” *Planta Med.*, vol. 73, no. 11, pp. 1182–1189, 2007, doi: 10.1055/s-2007-981598.

5. Prilozi

Prilog 1. Rezultati analize dietil-eterskog ekstrakta destilacione vode " Juniperus oxycedrus - ISTRa " spregnutim sistemom gasna hromatografija-masena spektrometrija (GC-MS) na kapilarnoj koloni HP-5MS.

Redni broj	Komponente	Površina ispod pika %
1	(2)-3-Hexen-1-ol	0.7
2	Methoxybenzene	0.4
3	(E)-3-Hexenoic acid	0.5
4	trans-2-Hexenoic acid	1.2
5	1,8-Cineole	0.3
6	Fenchone	0.4
7	Linalool	1.4
8	2-Phenylethanol	0.9
9	Chrysanthenone	0.6
10	trans-p-2,8-Menthadien-1-ol	0.4
11	Isopinocarveol	1.5
12	(E,E)-2,4-Decadienal	1.2
13	p-Mentha-1,5-dien-8-ol	1.2
14	4-Isopropylcyclohexanone	0.4
15	Borneol	1.9
16	Terpinene-4-ol	2.5
17	4-(1-Methylethyl)-benzyl alcohol	1.4
18	p-Cymen-8-ol	3.4
19	α -Terpineol	7.6
20	Myrtenol	1.3
21	Nopol	1.1
22	Verbenone	3.4
23	trans-Carveol	3.6
24	cis-Carveol	1.4
25	Carvone	1.2
26	α -Campholenic acid	0.3
27	Carvacrol	2.1
28	Piperitenone	0.8
29	1-Methyl-4-(1-methyl ethenyl)-1,2-cyclohexanediol	2.2
30	Eugenol	1.3
31	Buthoxyethoxy acetate	0.3
32	Methyleugenol	4.3
33	4-Isopropylbenzoic acid	0.5
34	2,6-di-terf-Buthyl-p-benzoquinone	0.7
35	4-Methyl-2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol	14.8
36	Elemicin	0.6
37	T-Muurolol	0.5

38	4-Isopropyl-6-methyl-1,2,3,4-tetrahydronaphtalen-1 - one	0.5
39	Caryophyllene oxide	1.7
40	Diisobuthyl phtalate	0.7
41	(Z) -9-octadecen-1 -ol	2.8
42	Hexadecanamide	1.5
43	Octadecanamide	1
Ukupno identifikovano		76.5%

Prilog 2. Rezultati analize dietil-eterskog ekstrakta destilacione vode " Lavandula angustifolia - ISTRa " spregnutim sistemom gasna hromatografija-masena spektrometrija (GC-MS) na kapilarnoj koloni HP-5MS.

Redni broj	Komponenta	Površina ispod pika %
1	3-Methyl-2-butenic acid	0.1
2	Methoxybenzene	0.1
3	1-Octen-3-ol	0.4
4	Hexanoic acid	0.1
5	6-Methyl-5-hepten-2-one	0.1
6	3-Octanol	0.1
7	3-Hexenoic acid	0.1
8	1,8-Cineole	0.2
9	Benzyl alcohol	0.2
10	4-Methyl-4-vinyl-butyrolactone	0.7
11	cis-Linalool oxide	3.8
12	trans-Linalool oxide	3.5
13	Linalool	19.6
14	Camphor	0.7
15	4-Isopropylcyclohexanone	0.8
16	Borneol	5.8
17	Epoxylinool	1.5
18	Terpinen-4-ol	17.0
19	p-Cymen-8-ol	2.2
20	α -Terpineol	13.6
21	Lavandulol oxide	0.2
22	Myrtenol	0.2
23	Verbenon	0.4
24	trans-Carveol	0.2
25	3,7-Dimethyloct-1-en-3,7-diol	4.0
26	Carvone	0.1
27	Piperitone	0.2
28	3,7-Dimethyl-1,7-octadiene-3,6-diol	1.0
29	p-Cymen-7-ol	0.7
30	Eucarvone	0.7
31	Neric acid	0.8
32	Eugenol	0.2
33	Geranic acid	3.2
34	Methyleugenol	0.6
35	Cuminic acid	0.5
36	Coumarin	3.1
37	4-Methyl-2,6-bis(1,1-dimethylethyl)phenol	1.9
38	Elemicin	0.1

39	a-Cadinol	0.4
40	7-Methoxycoumarin	0.8
41	(Z)-9-Octadecen-1 -ol	0.3
Ukupno identifikovano		90,2%

Prilog 3. Rezultati analize dietil-eterskog ekstrakta destilacione vode " Rosmarinus officinalis - ISTRAN" spregnutim sistemom gasna hromatografija-masena spektrometrija (GC-MS) na kapilarnoj koloni HP-5MS.

Redni broj	Komponenta	Površina ispod pika %
1	Methoxybenzene	0.1
2	3-Methylpentanoic acid	0.1
3	1-Octen-3-ol	0.1
4	3-Octanone	0.2
5	3-Octanol	0.1
6	1,8-Cineole	6.4
7	cis-Linalool oxide	0.1
8	Linalool	2.4
9	Chrysanthenone	1.1
10	trans-Pinocarveol	0.2
11	Camphor	7.6
12	Pinocamphone	0.1
13	Pinocarvone	0.1
14	Borneol	10.9
15	Isopinocamphone	0.5
16	Terpinen-4-ol	3.4
17	p-Cymen-8-ol	0.3
18	α -Terpineol	8.3
19	Myrtenol	0.9
20	Verbenone	41.8
21	trans-Carveol	0.2
22	3,7-Dimethyloct-1-en-3,7-diol	0.2
23	Geraniol	0.3
24	Thymol	0.1
25	2,3,5,6-Tetramethylphenol	0.2
26	Neric acid	0.3
27	Piperitenone	0.4
28	Eugenol	0.6
29	Geranic acid	0.6
30	Methyleugenol	1.2
31	4-Methyl-2,6,-bis(1,1-dimethylethyl)phenol	2.0
32	Elemicin	0.2
33	(Z)-9-Octadecen-1-ol	0.3
Ukupno identifikovano		91,3%

Prilog 4. Rezultati analize dietil-eterskog ekstrakta destilacione vode " Foeniculum vulgare - ISTRa " spregnutim sistemom gasna hromatografija-masena spektrometrija (GC-MS) na kapilarnoj koloni HP-5MS.

Redni broj	Komponenta	Površina ispod pika %
1	Methoxybenzene	0.3
2	1-Octen-3-ol	0.1
3	3-Octanone	0.2
4	1,8-Cineole	5.3
5	1 -Phenylethanone	0.2
6	Fenchone	40
7	Linalool	4.6
8	2-Phenylethanol	0.3
9	Fenchol	0.8
10	<i>trans</i> -1 -Methyl-4- (1 -m ethylethyl) -2-cyclohexen-1-ol	1
11	Camphor	1.7
12	4-Isopropylhexanone	0.1
13	2,4-Dimethylphenol	0.2
14	Terpinene-4-ol	3.2
15	p-Cymen-8-ol	0.3
16	α -Terpineol	2.9
17	Methyl Chavicol (Estragole)	4.4
18	Chrysanthenone	0.4
19	<i>trans</i> -Carveol	0.2
20	3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol	0.2
21	Geraniol	0.3
22	Anethole	1
23	Eugenol	0.8
24	Buthoxyethoxyethyl acetate	0.2
25	1- (4-Methoxyphenyl) -1 -propanol	0.2
26	Methyleugenol	2.3
27	Coumarin	0.2
28	p-Methoxypropiofenone	0.2
29	4-Methyl- 2,6-bis(1,1 -dimethylethyl) -phenol	8.8
30	Elemicin	0.3
31	α -Cedrol	0.2
32	Diisobuthyl phtalate	0.4
33	Hexadecanoic acid	1.2
34	(2)-9-Octadecen-1-ol	7.2
Ukupno identifikovano		89.7%

Prilog 5. Vrednosti medijana sa interkvartalnim rasponom (25. i 75. percentil) za sve grupe uzoraka i sve merene parametre

	Medi(r)a (c=25%,50%,100%)	Medi(r)a (c=25%,50%,100%) sa dodatkom TBH	Serum	Serum sa dodatkom TBH	Troloks	Troloks sa dodatkom TBH
TAS ($\mu\text{mol/L}$)	1638.06 (1597.80-1657.20)	1604.86 (1583.94-1642.47)	661.99 (628.01-695.97)	733.78 (711.68-755.87)	809.78 (751.94-867.63)	751.74 (732.69-770.80)
TOS ($\mu\text{mol/L}$)	124.77 (123.20-130.00)	126.83 (124.75-128.01)	123.18 (110.64-135.73)	128.65 (127.24-130.07)	112.77 (109.66-115.68)	125.65 (123.73-127.58)
PAB (U/L)	3.23 (2.77-4.23)	2.30 (1.97-3.10)	97.80 (94.63-100.97)	113.10 (112.23-113.97)	84.57 (81.63-87.50)	96.03 (95.43-96.63)
AOPP ($\mu\text{mol/L}$)	90.60* (90.40-90.60)	109.30 (90.80-129.00)	118.45 (111.80-125.10)	121.95 (120.70-123.20)	117.60 (114.20-121.00)	119.90 (115.30-124.50)
SHG (mmol/l)	1.17* (0.84-1.73)	0.77 (0.64-0.98)	0.55 (0.53-0.58)	0.47 (0.46-0.48)	0.51 (0.50-0.51)	0.48 (0.44-0.52)
PON1 (U/L)	208.50 (198.00-216.00)	195.00 (169.00-213.00)	170.00 (164.00-176.00)	217.50 (188.00-247.00)	183.50 (182.00-185.00)	196.50 (194.00-199.00)
TAS/TOS	13.13 (11.94-13.66)	12.64 (11.24-13.04)	5.46 (4.63-5.88)	5.70 (5.59-5.76)	7.20 (6.46-7.56)	5.98 (5.74-6.11)

*-uzorak bez TBH vs uzorak sa dodatkom TBH, nivo značajnosti $p < 0,05$; za nivo značajnosti $p < 0,01$ i $p < 0,001$ nije bilo statistički značajnih razlika između uzoraka bez i sa dodatkom TBH

Prilog 6. Tabele p-vrednosti dobijene poređenjem svih grupa uzoraka za svaki od merenih parametara

TAS	1	2	3	4	5	6
1	-	p=0,748	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
2	-	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
3	-	-	-	p=0,121	p=0,121	p=0,121
4	-	-	-	-	p=0,439	p=0,439
5	-	-	-	-	-	p=0,439
6	-	-	-	-	-	-

1 - Medi(r)a (c=25%,50%,100%); 2 - Medi(r)a sa dodatkom TBH; 3 - serum; 4 - serum sa dodatkom TBH; 5 - Troloks; 6 - Troloks sa dodatkom TBH

TOS	1	2	3	4	5	6
1	-	p=0,522	p=1,000	p=0,317	p<0,05	p=0,739
2	-	-	p=0,739	p=0,317	p<0,05	p=0,739
3	-	-	-	p=1,000	p=0,439	p=1,000
4	-	-	-	-	p=0,121	p=0,439
5	-	-	-	-	-	p=0,121
6	-	-	-	-	-	-

1 - Medi(r)a (c=25%,50%,100%); 2 - Medi(r)a sa dodatkom TBH; 3 - serum; 4 - serum sa dodatkom TBH; 5 - Troloks; 6 - Troloks sa dodatkom TBH

PAB	1	2	3	4	5	6
1	-	p=0,054	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
2	-	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
3	-	-	-	p=0,333	p=0,333	p=1,000
4	-	-	-	-	p=0,121	p=0,121
5	-	-	-	-	-	p=0,121
6	-	-	-	-	-	-

1 - Medi(r)a (c=25%,50%,100%); 2 - Medi(r)a sa dodatkom TBH; 3 - serum; 4 - serum sa dodatkom TBH; 5 - Troloks; 6 - Troloks sa dodatkom TBH

AOPP	1	2	3	4	5	6
1	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
2	-	-	p=1,000	p=1,000	p=1,000	p=1,000
3	-	-	-	p=1,000	p=1,000	p=1,000
4	-	-	-	-	p=0,439	p=1,000
5	-	-	-	-	-	p=0,439
6	-	-	-	-	-	-

1 - Medi(r)a (c=25%,50%,100%); 2 - Medi(r)a sa dodatkom TBH; 3 - serum; 4 - serum sa dodatkom TBH; 5 - Troloks; 6 - Troloks sa dodatkom TBH

SHG	1	2	3	4	5	6
1	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
2	-	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
3	-	-	-	p=0,121	p=0,121	p=0,121
4	-	-	-	-	p=0,121	p=1,000
5	-	-	-	-	-	p=1,000
6	-	-	-	-	-	-

1 - Medi(r)a (c=25%,50%,100%); 2 - Medi(r)a sa dodatkom TBH; 3 - serum; 4 - serum sa dodatkom TBH; 5 - Troloks; 6 - Troloks sa dodatkom TBH

PONI	1	2	3	4	5	6
1	-	p=0,262	p<0,05	p=0,739	p=0,182	p=0,317
2	-	-	p=0,317	p=0,505	p=0,505	p=0,739
3	-	-	-	p=0,121	p=0,121	p=0,121
4	-	-	-	-	p=0,121	p=1,000
5	-	-	-	-	-	p=0,121
6	-	-	-	-	-	-

1 - Medi(r)a (c=25%,50%,100%); 2 - Medi(r)a sa dodatkom TBH; 3 - serum; 4 - serum sa dodatkom TBH; 5 - Troloks; 6 - Troloks sa dodatkom TBH

TAS/TOS	1	2	3	4	5	6
1	-	p=0,423	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
2	-	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
3	-	-	-	p=1,000	p=0,121	p=1,000
4	-	-	-	-	p=0,121	p=0,439
5	-	-	-	-	-	p=0,121
6	-	-	-	-	-	-

1 - Medi(r)a (c=25%,50%,100%); 2 - Medi(r)a sa dodatkom TBH; 3 - serum; 4 - serum sa dodatkom TBH; 5 - Troloks; 6 - Troloks sa dodatkom TBH