



Univerzitet u Novom Sadu
Prirodno-matematički fakultet
Departman za hemiju, biohemiju i
zaštitu životne sredine



Marija Lesjak

**BIOPOTENCIJAL I HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA
EKSTRAKATA I ETARSKIH ULJA VRSTA RODA *JUNIPERUS L.*
(CUPRESSACEAE)**

-doktorska disertacija-

Novi Sad, 2011.

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u laboratoriji za biohemiju lekovitog bilja na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu, u okviru realizacije projekata Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije br. 142036 i 172058.

Dugujem duboku zahvalnost svom mentoru prof. dr Nedi Mimici-Dukić, na pruženoj prilici da učim i radim ono što volim, dragocenim, ljudskim i stručnim savetima i pomoći tokom celog mog studiranja i rada. Zahvaljujem se prof. dr Kseniji Kuhajdi za svu podršku i interesovanje za moj rad. Posebnu zahvalnost dugujem docentu dr Ivani Beari na svesrdnoj pomoći, brojnim idejama i sugestijama u planiranju, izvođenju eksperimentalnog dela i pisanju teze, a iznad svega na iskrenom prijateljstvu. Za izbor, sakupljanje i determinaciju biljnog materijala, korisne savete i pomoć tokom izrade ove teze, veliku zahvalnost dugujem docentu dr Biljani Božin i docentu dr Goranu Anačkovu. Zahvaljujem se docentu dr Dejanu Orčiću, Emiliji Jovin, mr Nataši Simin, Kristini Balog i Marini Francišković za svakodnevnu pomoć i veliku podršku tokom rada. Od velikog značaja bila mi je saradnja sa docentom dr Petrom Kneževićem u izvođenju i analizi antimikrobnih testova, na čemu mu se toplo zahvaljujem. Hvala zdravstvenim radnicima sa Instituta za transfuziju krvi Vojvodine na ustupljenim preparatima trombocita. Hvala Ružici Marušić, Jovani Francuz i Sanji Dožić na velikom prijateljstvu tokom studiranja i rada, a svim zaposlenima na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine na pomoći i kolegijalnosti. Hvala svim mojim studentima na velikoj pomoći. Đorđiju hvala na nesebičnom razumevanju, a svim prijateljima na prijateljstvu.

Mojoj porodici, bratu i roditeljima, beskrajno hvala na ljubavi i podršci.

Novi Sad, avgust 2011.

Marija

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	4
2.1. Rod <i>Juniperus</i> L. (Cupressaceae) i njegov taksonomski položaj	4
2.1.1. Biološke karakteristike vrsta roda <i>Juniperus</i> L.	4
2.1.2. Fitohemijski sastav i biološka aktivnost vrsta roda <i>Juniperus</i> L.	10
2.2. Slobodni radikali i oksidativni stres	20
2.2.1. Antioksidansi i određivanje antioksidantnog potencijala	23
2.3. Inflamacija i metabolizam arahidonske kiseline	27
2.3.1. Arahidonska kiselina	30
2.3.2. Biosinteza eikozanoida	32
2.3.3. Ciklooksigenazni put metabolizma arahidonske kiseline i fiziološka dejstva nastalih produkata	36
2.3.4. Lipooksigenazni putevi metabolizma arahidonske kiseline i fiziološka dejstva nastalih produkata	43
2.3.5. Inhibitori enzima ciklooksigenaznog i lipooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline	52
2.4. Antimikrobna aktivnost i etarska ulja	56
3. EKSPERIMENTALNI DEO	58
3.1. Priprema biljnih ekstrakata i etarskih ulja	58
3.2. LC-MS/MS skrining odabranih fenolnih jedinjenja	61
3.3. GC-MS analiza etarskih ulja	62
3.3.1. Obrada podataka	63
3.4. Određivanje antioksidantnog potencijala	64
3.4.1. Određivanje neutralizacije DPPH [•] radikala	64
3.4.2. Određivanje kapaciteta „hvatanja“ HO [•] radikala	67
3.4.3. Određivanje kapaciteta „hvatanja“ O ₂ ^{•-} radikala	70
3.4.4. Određivanje kapaciteta „hvatanja“ NO [•] radikala	72
3.4.5. Određivanje inhibicije lipidne peroksidacije	75
3.4.6. Određivanje redukcionog potencijala (FRAP test)	78
3.4.7. Određivanje sadržaja ukupnih fenola	80
3.4.8. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida	82
3.5. Određivanje antiinflamatornog potencijala	84
3.5.1. Određivanje broja trombocita	84
3.5.2. Eksperimentalni postupak za određivanje antiinflamatorne aktivnosti	85

3.6. Određivanje antimikrobnog potencijala	88
3.6.1. Sojevi bakterija	88
3.6.2. Disk difuzioni test	89
3.6.3. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) etarskih ulja	90
4. DISKUSIJA I REZULTATI	91
4.1. Fitohemijski skrining	91
4.1.1. LC-MS/MS skrining odabranih fenolnih jedinjenja	91
4.1.2. GC-MS analiza etarskih ulja	95
4.2. Antioksidantni potencijal	100
4.3. Antiinflamatorni potencijal	112
4.3.1. Optimizacija LC-MS/MS parametara za praćenje PGE ₂ i TXB ₂	112
4.3.2. Određivanje antiinflamatornog potencijala	118
4.4. Antimikrobni potencijal	127
5. ZAKLJUČAK	135
6. SUMMARY	142
7. LITERATURA	145
8. PRILOG	163
8.1. Fitohemijski skrining	163
8.1.1. LC-MS/MS skrining odabranih fenolnih jedinjenja	163
8.1.2. GC-MS analiza etarskih ulja	166
8.2. Antioksidantni potencijal	169
8.2.1. Neutralizacija DPPH [•] radikala	169
8.2.2. Kapacitet „hvatanja“ HO [•] radikala	180
8.2.3. Kapacitet „hvatanja“ O ₂ ^{•-} radikala	186
8.2.4. Kapacitet „hvatanja“ NO [•] radikala	192
8.2.5. Inhibicija lipidne peroksidacije	198
8.2.6. Redukcioni potencijal (FRAP test)	209
8.2.7. Sadržaj ukupnih fenola	211
8.2.8. Sadržaj ukupnih flavonoida	213
8.3. Antiinflamatorni potencijal	215
8.3.1. Potencija inhibicije produkcije 12-HHT	215
8.3.2. Potencija inhibicije produkcije TXB ₂	223
8.3.3. Potencija inhibicije produkcije PGE ₂	231
8.3.4. Potencija inhibicije produkcije 12-HETE	237
8.4. Antimikrobni potencijal	246
9. SKRAĆENICE	249

1. UVOD

Kroz istoriju čovečanstva, biljke su bile najznačajniji izvor biološki aktivnih supstanci i lekova. Naučne discipline, poput fitohemije i farmakognozije, bile su tesno povezane sa razvojem moderne organske hemije koja doživljava procvat u devetnaestom i dvadesetom veku, kada je hemijski i biohemijski okarakterisan veliki broj biljnih vrsta, a iz njih izolovano i identifikovano blizu 20.000 bioaktivnih sekundarnih biomolekula. Uzimajući u obzir i to da broj cvetnica (angiosperme) koje su hemijski ispitane čini samo 10%, od ukupno 250.000 vrsta na planeti, može da se zaključi da biljni svet i dalje predstavlja nepresušan i još nedovoljno istražen resurs biološki i farmakološki aktivnih jedinjenja. Međutim, nagli razvoj organske hemije, prvenstveno trend primene kombinatorne hemije u dizajniranju lekova, a pogotovo HTS (*High Throughput Screening*) skrininga, doveo je do pada interesovanja za prirodne proizvode u poslednjoj dekadi prošlog veka. Kako su, po proceni velikog broja naučnika (Ortholand i Ganesan, 2004; Barnes i Prasain, 2005), očekivanja ovih istraživanja precenjena, u poslednjih nekoliko godina svetska naučna javnost ponovo se usmerava na istraživanja prirodnih molekula kao novih lekova i fitopreparata. Pored neospornog značaja za farmaceutsku industriju, prirodni proizvodi biljaka nalaze široku primenu u proizvodnji dijetetskih suplemenata i funkcionalne hrane, koja pored zadovoljavajućih nutritivnih svojstava ispoljava i određene farmakološke i fiziološke efekte na ljudsko zdravlje, što je od velikog značaja u prevenciji nastanka bolesti savremenog čoveka. Zbog toga su ispitivanja bioloških aktivnosti i hemijska karakterizacija do sad neispitanih biljnih vrsta od izuzetnog naučnog i praktičnog interesa, jer vode ka novim izvorima potentnih, biološki aktivnih prirodnih proizvoda.

Na teritoriji Balkanskog poluostrva raste veliki broj vrsta roda *Juniperus* L., u narodu poznatijeg pod imenom kleka. Biljke ovog roda od davnina su poznate u tradicionalnoj medicini i koriste se za lečenje raznih oboljenja, kao što su: prehlada, zapaljenje pluća i urinarnog trakta, dermatološki poremećaji, bronhitis, reumatoidni artritis, dijareja, ublažavanje menstrualnih bolova i dr. Pored toga, fitopreparati dobijeni od različitih vrsta kleke poznate su kao dobri analgetici, diuretici, antiseptici, hipoglikemici, kao i antiinflamatorni i hipotenzivni agensi, potentni izazivači abortusa i sredstvo protiv crevnih parazita (Kozan i sar., 2006; Thomas i sar., 2007; Akkol i sar., 2009; Miceli i sar., 2009).

Takođe, neke vrste kleke koriste se u kulinarstvu kao začini i aromatični principi u proizvodnji alkoholnih pića (*The Silver Spoon*, 2005; Loizzo i sar., 2007; Łuczaj i Szymański, 2007; Hamyl, 2009; MacMillan, 2010). Međutim, i pored široko rasprostranjene tradicionalne primene kao medikamenata ili dodataka ishrani, većina ovih vrsta nije detaljno okarakterisana i u literaturi postoji vrlo malo podataka o biološkoj aktivnosti i hemijskom sastavu kako ekstrakata, tako i etarskih ulja iglica i šišarki kleke. Naime, dosadašnja fitohemijska i biohemijska istraživanja obuhvatala su samo nekoliko vrsta roda *Juniperus*. Hemijska ispitivanja odnosila su se na detekciju i karakterizaciju fenolnih jedinjenja, uglavnom flavonoida, neolignana i fenilpropanoida (Abul'saeva i Pashinina, 1982; Nakanishi i sar., 2004b; Miceli i sar., 2009; Iida i sar., 2010) i isparljivih terpenoida (Topçu i sar., 1999; Emami i sar., 2007; Ennajar i sar., 2009; Medini i sar., 2010). Biohemijska i biološka istraživanja sprovedena su na vrstama *J. communis* (Agelet i Valles 2003; Gautam i sar., 2007) i *J. oxycedrus* (Kozan i sar., 2006; Moreno i sar., 1998), dok su podaci za ostale vrste ili veoma oskudni ili ih uopšte nema. Najveći broj literaturnih navoda odnosi se na određivanje antimikrobnog delovanja etarskih ulja kleke. Malobrojni su i radovi koji potvrđuju antioksidantnu aktivnost predstavnika roda *Juniperus*. (Emami i sar., 2007; Miceli i sar., 2009; Ennajar i sar., 2009; Moein i sar., 2010). Antiinflamatorni potencijal kleke bio je predmet istraživanja nekoliko naučnih radova, u kojima su korišćeni uobičajeni, *in vivo* testovi, na eksperimentalnim životinjama (Akkol i sar., 2009; Neves i sar., 2010).

Polazeći od pretpostavke da bi i ostale, do sada neistražene vrste roda *Juniperus* koje rastu na teritoriji Balkanskog poluostrva, mogle biti potencijalni izvori novih biološki aktivnih jedinjenja, ova doktorska teza imala je za cilj sprovođenje detaljnih fitohemijskih i biohemijskih ispitivanja osam vrsta kleke sakupljenih sa različitih lokaliteta Republike Srbije, Hrvatske i Makedonije: *Juniperus communis* L. 1753 var. *communis*, *Juniperus macrocarpa* Sibth. et Sm 1816, *Juniperus excelsa* M. Bieb. 1800, *Juniperus sibirica* Burgsdorf. 1787, *Juniperus foetidissima* Willd. 1806, *Juniperus oxycedrus* L. 1753 var. *oxycedrus*, *Juniperus sabina* L. 1753 var. *sabina* i *Juniperus phoenicea* L. 1753 var. *phoenicea*.

Cilj fitohemijskih ispitivanja bila je identifikacija i kvantifikacija fenolnih jedinjenja i isparljivih terpenoida u iglicama i šišarkama ispitivanih vrsta roda *Juniperus*, kako bi se izvršila hemijska i hemotaksonomska karakterizacija ispitivanih vrsta.

Cilj biohemijskih ispitivanja, bila je evaluacija antioksidantne, antiinflamatorne i antimikrobne aktivnosti ispitivanih vrsta kleke radi utvrđivanja njihovog terapijskog potencijala. Procena antioksidantne aktivnosti vršena je na osnovu praćenja sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala (DPPH[•], HO[•], NO[•] i O₂^{•-}), redukcionog potencijala i inhibicije lipidne peroksidacije. Antiinflamatorni potencijal ekstrakata i etarskih ulja kleke određen je *ex vivo* metodom u humanim trombocitima primenom LC-MS/MS tehnike. Primenjena metoda zasnovana je na određivanju sposobnosti inhibicije produkcije četiri medijatora inflamacije (TXB₂, PGE₂, 12-HHT i 12-HETE), koji su produkti metabolizma arahidonske kiseline. Antimikrobna aktivnost određena je primenom standardnih metoda, disk difuzioni i agar dilucioni metod, na seriju Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija, koje su uzrok mnogih infekcija, a poznato je i da neprekidno razvijaju sve veću rezistentnost na postojeće antibiotike.

2. OPŠTI DEO

2.1. Rod *Juniperus* L. (Cupressaceae) i njegov taksonomski položaj

Rod *Juniperus* L. pripada porodici Cupressaceae i obuhvata 67 vrsta i 34 varijeteta, koji su skoro isključivo rasprostranjeni na severnoj hemisferi, sa jednom vrstom koja se prostire na teritoriji Afričkog kontinenta. Postoji više infrageneričkih klasifikacija roda *Juniperus*, međutim, jedna od novijih je Adamsova klasifikacija (2008), gde se rod *Juniperus* deli na tri podroda: *Caryocedrus* (1 vrsta), *Juniperus* (sadrži 10 vrsta) i *Sabina* (sadrži 56 vrsta). Za potrebe jasne diferencijacije između podrodova, kao i nižih taksonomskih kategorija, vršena su kompleksna taksonomsko-filogenetska istraživanja roda *Juniperus*. Filogenetska istraživanja obuhvatala su analizu morfoloških karakteristika, sastava etarskih ulja raznih delova biljke (iglica i drveta) i genetska istraživanja na više nivoa. Kompleksna genetska istraživanja obuhvatala su u osnovi metod lančane reakcije polimeraze (PCR - *Polymerase Chain Reaction*), a dobijeni izolati podvrgnuti su vešestrukim analizama *Internal Transcribed Spacer* (ITS) i *Inter-Simple Sequence Repeat* (ISSR) sekvenci kao i analizom *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD) sa ciljem da se dobiju informacije o genetičkoj polimorfnosti vrsta i infraspecijskih kategorija istraživanog roda. Ove analize dale su podatke koji su značajno doprineli taksonomskom raščlanjenju pojedinih vrsta. Tako detaljna diferencijacija vrsta i infraspecijskih taksona u slučaju roda *Juniperus* nije mogla da se bude izvršena na osnovu morfoloških analiza i hemijske karakterizacije etarskih ulja ili neke druge grupe jedinjenja, zato što su te karakteristike promenljive u odnosu na ekološke faktore (Adams i Demeke, 1993; Adams, 1998; Adams, 1999; Adams, 2000a; Adams, 2000b; Adams i sar., 2003; Adams, 2004; Adams i sar., 2008).

2.1.1. Biološke karakteristike vrsta roda *Juniperus* L.

Biljke iz roda *Juniperus*, u narodu najpoznatije pod imenom kleka, su zimzeleno drveće ili grmovi sa ljuspastim ili igličastim listovima, koji su poredani po dva naspramno ili po tri u pršljenovima. Biljke su jednodomne ili dvodomne. Muške šišarke (mikrostrobilusi)

sastavljeni su od naspramno ili pršljenasto poređanih mikrosporofila, koji na donjoj strani nose po 3 do 5 mikrosporangija. Mikrospore (polenova zrna) su bez vazdušnih mehurova. Semene ljuspe su potpuno srasle sa pokrovnim (zaštitnim) ljuspama i na gornjoj strani nose jedan ili više semenih zametaka. Međusobno srasle semene (plodne) i pokrovne (zaštitne) ljuspe grade tvorevine-epimacijume, koji su poređani naspramno ili u tročlanim pršljenovima (Jovanović, 1992). Zrele ženske šišarke su bobičaste, mesnate i sočne, ljubičaste, crvene ili narandžaste boje. Za područje Republike Srbije navodi se pet autohtonih taksona roda, kao i više vrsta koje se koriste kao dekorativne biljke, a poreklom su iz udaljenijih krajeva (*Tabela 2.1.*) (Jovanović, 1992). Novija istraživanja flore Republike Srbije, naročito njenih južnih delova, i komparacija biljnog materijala u referentnim herbarskim zbirkama pokazuju da vrsta *J. excelsa* nije potvrđena na prostoru južne Srbije (dolina reke Pčinje) kako je to ranije navedeno (Mišić, 1981; Jovanović, 1992), te prisustvo ovog taksona u flori Republike Srbije treba uzimati sa rezervom.

Tabela 2.1. Pregled autohtonih i gajenih taksona roda *Juniperus* u Republici Srbiji

<i>autohtoni taksoni</i>	
Sect. <i>Juniperus</i>	<i>Juniperus communis</i> L. 1753 var. <i>communis</i> <i>Juniperus sibirica</i> Burgsdorf. 1787 (= <i>Juniperus communis</i> L. 1753 var. <i>saxatilis</i> Pall. 1789; <i>Juniperus nana</i> Willd. 1796) <i>Juniperus oxycedrus</i> L. 1753 var. <i>oxycedrus</i>
Sect. <i>Sabina</i>	<i>Juniperus sabina</i> L. 1753 var. <i>sabina</i> <i>Juniperus excelsa</i> M. Bieb. 1800
<i>gajeni taksoni</i>	
Sect. <i>Sabina</i>	<i>Juniperus squamata</i> Buchanan-Hamilton ex D. Don in Lambert 1824 var. <i>squamata</i> <i>Juniperus foetidissima</i> Willd. 1806 <i>Juniperus chinensis</i> L. 1767 var. <i>chinensis</i> <i>Juniperus horizontalis</i> Moench. 1794 <i>Juniperus virginiana</i> L. 1753 var. <i>virginiana</i>

U ovom radu, ispitano je osam taksona roda *Juniperus*, koje rastu na širem prostoru centralnog i zapadnog dela Balkanskog poluostrva, kao autohtone ili gajene biljke. Većina autohtonih taksona, koji su analizirani u ovom radu, pripada grupi vrsta mediteranskog porekla, izuzimajući panarктиčku vrstu *J. communis*.

Juniperus communis L. (Slika 2.1.), u narodu poznata kao kleka ili obična borovica, venja ili po negde i smreka, je žbun ili drvo, visoko do 12 m, sa jajastom i kupastom krošnjom. Listovi su igličasti, raspoređeni po tri u pršljenu, povijeni, kruti, ušiljeni, dužine 7-16 mm, na sredini lica nalazi se bela traka stominih otvora, a bočno se nalaze dve zelene trake. Šišarke se razvijaju u periodu april-jun. Bobičaste, zrele ženske šišarke debele su 6-9 mm, okruglaste, a u fazi pozne zrelosti imaju ljubičastu boju. Ova vrsta kleke je široko rasprostranjena po celoj Evropi, Severnoj Aziji i Severnoj Americi. Na teritoriji Republike Srbije takođe je široko rasprostranjena, od Fruške gore i Deliblatske peščare pa do južnih krajeva zemlje. Šišarke ove vrste u narodu su najpoznatije kao dodatak u procesu proizvodnje rakije klekovače, a koristi se i u dekorativne svrhe. U ovom radu ispitivan je tipičan varijetet *Juniperus communis* var. *communis* koji se rasprostire na teritoriji Evrope i centralne Azije (Jovanović, 1992; Adams, 2008).

Juniperus macrocarpa Sibth. et Sm. (Slika 2.2.), je vrsta u narodu poznata kao pukinja ili ljuskavac. To je grm ili malo drvo visoko 5-6 m, piramidalnog habitusa, a kasnije se sve više zaokružuje. Grančice su usmerene prema gore, listovi su igličasti i dugi 2-3 cm, dosta meki, sa gornje strane imaju dve bele



Slika 2.1. *Juniperus communis* L.
(http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Juniperus_communis_communis_Italy.jpg, april 2011.)



Slika 2.2. *Juniperus macrocarpa*
Sibth. et Sm.
(<http://www.pinetum.org/cones/JUcones.htm>, april 2011.)

pruge. Zrele ženske šišarke su krupne, 1.2-1.5 cm, okruglaste, jestive, crveno-smeđe ili tamnosivo-smeđe boje, nemaju sjaja, sastoje se od 3, a retko od 6 ljuski (epimacijuma) sa po tri semenke. Karakteristična je mediteranska vrsta rasprostranjena od Španije do Sirije, gde ulazi dublje u kontinent i nastanjuje termofilna submediteranska staništa. Raste na degradiranim zemljištima, a koristi se i u hortikulturi (Vidaković, 1982).

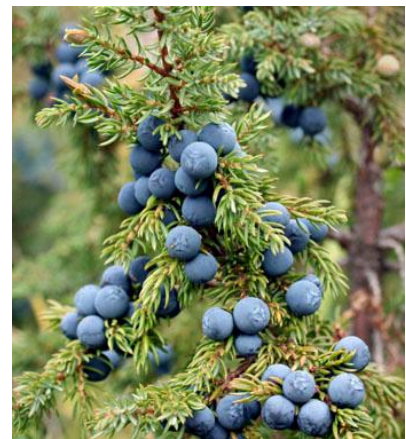


Slika 2.3. *Juniperus excelsa* M. Bieb.
(http://laspi.russian-women.net/big/laspi_07358.shtml,
april 2011.)

Juniperus excelsa M. Bieb. (Slika 2.3.), u narodu poznata kao divlja ili gorska foja, je visok žbun ili drvo visine do 20 m, sa krošnjom na početku čunjasto-pirimidnom, a kasnije više okruglastom. Mlade grane su tanke, od jedva 1 mm debljine, sa heteromorfnim listovima. Ljuspaste iglice, odnosno listovi su 1-2 mm dužine, prilegle uz granu, naspramne, poredane u 4 reda i tupe. Jedino se na starijim jedinkama ponekad pojavljuje igličasto lišće, koje je 5-6 mm dugo i sa gornje strane ima dve plavičaste pruge. Muške šišarke su žute, a ženske zelenkasto-ružičaste boje. Zrela ženska šišarka je okrugla, sazreva u drugoj godini života biljke, prečnika je oko 0.9 cm, a u fazi punog zrenja ima

zagasitu smeđe-ljubičastu boju i sadrži 3-6 semenki. Ova vrsta raste na Balkanskom poluostrvu i u Maloj Aziji do Kavkaza, na Krimu, Himalajima i Tibetu (Vidaković, 1982).

Juniperus sibirica Burgsdorf. (Slika 2.4.) je nizak žbun sa gustim i kratkim granama poleglim na zemlju. Iglice su duge 0.1-1 cm i sabljasto savijene prilegle uz grančicu, sa naglo zašiljenim vrhom. Lice im je udubljeno, beličaste boje, a naličje je tamno zelene boje i sjajno. Šišarke sazrevaju u maju. Zrele ženske šišarke su veličine 7-10 mm, jajaste ili okrugle. Rasprostranjenje ovog taksona obuhvata alpski i subalpski pojas planina Evrope,



Slika 2.4. *Juniperus sibirica*
Burgsdorf.

(<http://www.rusbiophoto.com/images/pages/03006182.jpg>, april 2011.)

Azije i Severne Amerike, kao i arktičke predele ovih kontinenata. U Republici Srbiji ova vrsta može se pronaći na Kopaoniku, Goliji, Mokroj planini, Suvoj planini, Staroj planini, Prokletijama i dr. (Jovanović, 1992).



Slika 2.5. *Juniperus foetidissima* Willd. (<http://www.photographersdirect.com/buyers/stockphoto.asp?imageid=147372> 9, april 2011.)

Juniperus foetidissima Willd. (Slika 2.5.), u narodu je poznata kao pitoma foja. Odlikuje je srednje visoko stablo koje naraste do 15 m, vitka krošnja, koja je piramidalna i spušta se do zemlje, i uspravljene grane. Igljice su dimorfne, ljuspaste ili igličaste, raspoređene u četiri reda, naspramno. Igličasti juvenilni listovi ili su primaknuti uz grančicu ili su od nje odvojeni gornjim delom. Ljuspasti listovi dugi su 1.5 mm, jajastotrouglasti, na vrhu zašiljeni. Kada se protrljaju, svi listovi imaju neprijatan miris. Zrele ženske šišarke su okruglog oblika, prečnika 6-12 mm, tamnoljubičaste boje, sazrevaju u drugoj godini i sadrže od jedne do tri semenke. Vrsta *J. foetidissima* rasprostranjena je na planinama južnog Balkana, na Krimu i u maloj Aziji (Jovanović, 1992).

Juniperus oxycedrus L. var. *oxycedrus* (Slika 2.6.), u narodu poznata kao smrika ili smrič, najčešće je veliki grm ili manje, dvodomno razgranato drvo, visoko do 8 m. Grane su dugačke i debele. Igljice su krute i dugačke 12-18 mm, veoma oštrog vrha, sa gornje strane sa dve bele pruge, a sa donje strane zelene sa uzdužnim ispupčenjem. Zrela ženska šišarka ima prečnik od 6-10 mm, mesnata je, crveno-smeđa ili crveno-žuta, sazreva u drugoj godini sa 1-4 semena. Široko je rasprostranjena po celom Mediteranu (Vidaković, 1982).



Slika 2.6. *Juniperus oxycedrus* L. (<http://ies-perevives.xtec.net/ernestfabregat/Botanica/plantes/Cupressaceae/Juniperus%20oxycedrus.htm>, april 2011)

Juniperus sabina L. var. *sabina* (Slika 2.7.), u narodu poznata kao planinska somina, je grm, visok do 5 m, sa nepravilnom krošnjom koja je uglavnom polegla. Igllice su dimorfne, i dok su mlade, oštre su, ljuspaste i unakrsno raspoređene. Igllice imaju neprijatan miris kad se protrljaju. Ovo je jednodomna ili dvodomna vrsta. Zrele ženske šišarke su okrugle, prečnika 5-7 mm, tamnoljubičaste boje i sazrevaju u drugoj godini. I iglice i šišarke su otrovne. Ova vrsta raste na većim nadmorskim visinama, a rasprostranjena je na planinama srednje i južne Evrope, Male Azije, Kavkaza, Urala i Sibira (Vidaković, 1982).



Slika 2.7. *Juniperus sabina* L.
(<http://cuadernodelcampo.blogspot.com/2011/02/visu-de-coniferas.html>, april 2011)

Juniperus phoenicea L. (Slika 2.8.), u narodu poznata kao primorska somina, je grm ili manje stablo, visoko do 6 m, guste krošnje. Igllice su ljuspaste, a dok su mlade, igličaste su. Ljuspasto lišće je čvrsto prileglo uz granu, po tri u pršljenu i 1 mm dugo. Ova vrsta je jednodomna ili dvodomna. Zrela ženska šišarka je okrugla, ima oko 10 mm u prečniku, žuto-smeđa je i sadži 3-9 semenki. Može da živi i do 1000 godina. Široko je rasprostranjena u Mediteranskom području, svuda oko Sredozemnog mora (Vidaković, 1982).



Slika 2.8. *Juniperus phoenicea* L.
(<http://cuadernodelcampo.blogspot.com/2011/02/visu-de-coniferas.html>, april 2011)

2.1.2. Fitohemijski sastav i biološka aktivnost vrsta roda *Juniperus* L.

Vrste roda *Juniperus* bile su predmet brojnih istraživanja, bilo da se radi o fitohemijskim ispitivanjima, biološkim, biohemijskim, fiziološkim i ekološkim studijama, a sve u cilju njihove bliže karakterizacije. Fitohemijska ispitivanja ukazuju na prisustvo različitih jedinjenja u vrstama roda *Juniperus*, od kojih su najviše ispitivani terpenoidi prisutni u etarskim uljima kleke. Međutim, za biološku aktivnost i terapijski efekat značajne su i druge klase sekundarnih biomolekula, a posebno klase pojedinih fenolnih jedinjenja. Od fenola, u nekim vrstama kleke dokazano je postojanje tanina (Frutos i sar., 2002), neolignana (Nakanishi i sar., 2004a), lignana (Feliciano i sar., 1990), fenilpropanoida (Comte i sar., 1997; Nakanishi i sar., 2004b; Iida i sar., 2010) i kumarina (de Pascual i sar., 1981). Iako su pojedine vrste kleke veoma poznate u tradicionalnoj medicini i kulinarstvu, postoji iznenađujuće malo podataka u literaturi o fenolnom sastavu iglica i šišarki kod vrsta ovog roda. Za većinu taksona koji su predmet ispitivanja ove doktorske disertacije, nema podataka o sastavu fenolnih jedinjenja. Vrsta *J. communis*, koja se široko koristi u kulinarstvu kao začini i sirovina za proizvodnju alkoholnih pića, najviše je istraživana u pogledu fenolnog sastava, ali su i ti podaci veoma oskudni i odnose se na mali broj identifikovanih jedinjenja. S obzirom na to da kleka i njeni proizvodi imaju veoma široku primenu u ljudskoj ishrani, evidentna je potreba za daljom detaljnom karakterizacijom fenolnog sastava vrsta roda *Juniperus*. Pregled navoda iz literature, koji prikazuju fenolni sastav ispitivanih vrsta kleke, dat je u Tabeli 2.2.

Tabela 2.2. Pregled podataka iz literature o analizi fenolnih komponenata u ekstraktima odabrabnih vrsta roda *Juniperus*

Vrsta iglice/šišarke	Referenca	Identifikovana fenolna jedinjenja
<i>J. communis</i>	šišarke Innocenti i sar., 2007; Miceli i sar., 2009; Kilic i sar., 2011	amentoflavon apigenin apigenin-heksozid biflavon gosipetin-heksozid gosipetin-heksozid-pentozid hidroksiluteolin hinokiflavon hipolaetin-7-pentozid hipolaetin-heksozid izoskutelarein-7- <i>O</i> -pentozid izoskutelarein-8- <i>O</i> -heksozid kupresoflavon kvercetin-3- <i>O</i> -pentozid kvercetin-heksozid kvercetin-heksozid- deoksiheksozid luteolin-pentozid metil-biflavon
<i>J. excelsa</i>	šišarke Kilic i sar., 2011	katehin
<i>J. sibirica</i>	šišarke Miceli i sar., 2009	amentoflavon apigenin apigenin-heksozid izoskutelarein-7- <i>O</i> -pentozid izoskutelarein-8- <i>O</i> -heksozid kupresoflavon kvercetin-heksozid metil-biflavon
<i>J. foetidissima</i>	šišarke Kilic i sar., 2011	/
<i>J. oxycedrus</i>	šišarke Kilic i sar., 2011	/
<i>J. sabina</i>	iglice Abul'saeva i Pashinina, 1982	apigenin zokvercitrin kvercetin-3- <i>O</i> -6- <i>O</i> -ramnozil- glukopiranozid kvercetin-3-ramnofuranozid
<i>J. phoenicea</i>	iglice Maatooq i sar., 1998	amentoflavon jaceidin jaceidin-7- <i>O</i> -metiletar kemferol-3- <i>O</i> -ramnozid kupresoflavon kvercetin kvercitrin miricitrin
	šišarke Kilic i sar., 2011	katehin

Za razliku od fenolnih jedinjenja, mnogo više podataka postoji o sastavu etarskih ulja pojedinih vrsta roda *Juniperus*. Od biljaka ispitivanih u okviru ove teze, najviše podataka o sastavu ulja nađeno je za vrste *J. communis* i *J. oxycedrus*, što je i razumljivo s obzirom na njihovu široku primenu, kako u tradicionalnoj medicini tako i u savremenoj fitoterapiji i ishrani. Činjenica da o ostalim vrstama nema mnogo podataka u literaturi, kao i da je sastav etarskih ulja veoma varijabilan i da je uslovljen kako genetskim tako i brojnim ekološkim faktorima, ukazuje na potrebu za detaljnom karakterizacijom isparljivih terpenoida različitih vrsta kleke sakupljenih sa raznih lokaliteta. Pregled navoda iz literature o analizi etarskih ulja iglica i šišarki vrsta roda *Juniperus*, koja su bila predmet istraživanja ove teze, dat je u *Tabeli 2.3*.

Tabela 2.3. Pregled podataka iz literature o analizi etarskih ulja iglica i šišarki odabranih vrsta roda *Juniperus*

Vrsta iglice/šišarke	Referenca
<i>J. communis</i>	iglice Vernin i sar., 1988; Chatzopoulou i Katsiotis, 1993; Hiltunen i Laakso, 1995; Angioni i sar., 2003; Shahmir i sar., 2003; Pourmortazavi i sar., 2004; Adams, 2008; Martz i sar., 2009; Adams i sar., 2010; Orav i sar., 2010
	šišarke Vernin i sar., 1988; Kallio i Jünger-Mannermaa 1989; Hiltunen i Laakso, 1995; Mastelić i sar., 2000; Angioni i sar., 2003; Damjanovic i sar., 2003; Filipowicz i sar. 2003; Ohno i sar., 2003; Shahmir i sar., 2003; Shin, 2003; Barjaktarović i sar., 2005; Gavini i sar., 2005; Chatzopoulou i Katsiotis, 2006; Damjanović i sar., 2006; Glišić i sar., 2007; Vichi i sar., 2007; Wei i Shibamoto, 2007; Orav i sar., 2010; Tserennadmid i sar., 2010
<i>J. macrocarpa</i>	iglice Adams, 2008
<i>J. excelsa</i>	iglice Thappa i sar., 1987; Mossa i sar., 1992; Muhammad i sar., 1992; Topçu i sar., 2005; Adams, 2008; Moein i sar., 2010; Shanjani i sar., 2010
	šišarke Topçu i sar., 1999; Soković i sar., 2004; Topçu i sar., 2005; Unlu i sar., 2008; Shanjani i sar., 2010
<i>J. sibirica</i>	iglice Karlsen i Svendsen, 2002; Adams, 2008; Adams i sar., 2010
	šišarke Karlsen i Svendsen, 2002
<i>J. foetidissima</i>	iglice Tunalier i sar., 2002; Adams, 2008
	šišarke Tunalier i sar., 2002
<i>J. oxycedrus</i>	iglice Milos i Radonic, 2000; Angioni i sar., 2003; Marongiu i sar., 2003; Boti i sar., 2006; Cavaleiro i sar., 2006; Dob i sar., 2006; Adams, 2008; Achak i Romane, 2009; Machado i sar., 2010; Medini i sar., 2010

	šišarke	Hernandez i sar., 1987; Milos i Radonic, 2000; Angioni i sar., 2003; Marongiu i sar., 2003; Boti i sar., 2006; Cavaleiro i sar., 2006; Loizzoi sar., 2007; Rajouani i sar., 2008; Derwich i sar., 2010; Machado i sar., 2010
<i>J. sabina</i>	iglice	Adams, 2008
	šišarke	Hernandez i sar., 1987
<i>J. phoenicea</i>	iglice	Adams i sar., 1996; El-Sawi i sar., 2007; Adams, 2008; Medini i sar., 2008; Achak i Romane, 2009; Garbou i sar., 2009; Ennajar i sar., 2009; Medini i sar., 2009; Derwich i sar., 2010a; Derwich i sar., 2010b; Mazari i sar., 2010; Derwich i sar., 2011
	šišarke	El-Sawi i sar., 2007; Ennajar i sar., 2009

Biološka ispitivanja vrsta roda *Juniperus* pokazala su da ekstrakti, etarska ulja i izolovane komponente poseduju brojne biološke aktivnosti, što potvrđuje i široku primenu vrsta roda *Juniperus* u tradicionalnoj medicini naroda Grčke, Turske, Egipta, Persije, Iraka, Irana, Sirije, Kine, američkih Indijanaca i dr. Ekstrakti i etarska ulja kleke korišćena su u lečenju prehlade, kašlja, leukoreje, glavobolje, urinarnih infekcija, hipoglikemije, urtikarije, dizenterije, dijareje, infekcija izazvanih crevnim parazitima, hemoroida, reumatoidnog artritisa, gihta, psorijaze, lepre, gojaznosti, opadanja kose, za regulaciju menstrualnog ciklusa i ublažavanje menstrualnih tegoba, za ublažavanje abdominalnih bolova druge etiologije, za povećanje apetita, za zarastanje rana i za zaustavljanje krvarenja razne etiologije. Takođe, od davnina je poznato da vrste roda *Juniperus* poseduju diuretsku, antiinflamatornu, antioksidantnu, antimikrobnu, antiviralnu, antifungalnu, analgetsku, antitumornu, citotoksičnu, vazodilatatornu, imunomodulatornu, antidiabetičku, antituberkuloznu aktivnost kao i abortivni efekat. Vrste koje su najviše upotrebljavane u narodu su *J. communis*, čije šišarke su se koristile za ublažavanje kašlja, lečenje hemoroida i ublažavanje bolova, a etarska ulja protiv urtikarije i *J. oxycedrus*, od čijih šišarki se kuvanjem pravio ekstrakt koji se konzumirao kod gastrointestinalnih poremećaja, prehlade, kao diuretik, kod bubrežne kalkuloze i za tretman kalcinoze u zglobovima, a mešavina iglica i šišarki u terapiji dijabetesa. Mnoge aktivnosti vrsta roda *Juniperus* su i eksperimentalno potvrđene. Među njima izdvajaju se antikancerogena aktivnost ekstrakta šišarki vrste *J. communis* na tumorske ćelije dojke MCF-7/AZ i neuroblastoma N-2A (Slambrouck i sar., 2007), kao i inhibicija apoptoze etarskim uljem dobijenim iz šišarki ove vrste (Na i sar., 2001). Dokazan je citotoksičan efekat ekstrakta grančica muške i ženske jedinke vrste *J. foetidissima* prema KB ćelijama humanog kancera epiderma, dok su grančice muške jedinke pokazale citotoksičan

efekat prema ćelijama humanog karcinoma grlića materice Hela i prema ćelijama humanog adenokarcinom dojke MDAMB-468. Takođe, ekstrakt šišarki *J. sabina* pokazao je citotoksičan efekat prema KB, Hela, HepG2 i SKOV3 ćelijskim linijama (Sadeghi-aliabadi i sar., 2009; Mazzio i Soliman, 2010; Shokrzadeh i sar., 2010), dok etarsko ulje *J. phoenicea* pokazuje antitumorsku aktivnost na karcinom mozga, grlića materice, pluća, jetre i dojke (El-Sawi i sar., 2007). Etarsko ulje šišarki *J. oxycedrus* ispoljava antivirusnu aktivnost u netoksičnim koncentracijama prema poliovirusu (Marongiu i sar., 2003). Ove biljne vrste koriste se od davnina i u veterini, u lečenju sličnih oboljenja kao kod čoveka. Pored toga, etarska ulja kleke mogu da se koriste i kao efikasni agensi protiv buva kod mačaka i pasa. Vrste roda *Juniperus* poseduju i insekticidno dejstvo, te se od davnina koriste u borbi protiv raznih štetnih insekata npr. vaški. O aktuelnosti istraživanja koja su vezana za biološke i farmakološke aktivnosti vrsta roda *Juniperus* svedoči i ogroman broj publikovanih radova (Agrawal i sar., 1980; Muhammad i sar., 1992; Sezik i sar., 1992; Yeşilada i sar., 1993; Fujita i sar., 1995; Izzo i sar., 1995; Yeşilada i sar., 1995; Honda i sar., 1996; Ritch-Krc i sar., 1996; Bello i sar., 1997; Moreno i sar., 1997; Sezik i sar., 1997; El-Sayed, 1998; Jones i sar., 1998; Moreno i sar., 1998; Bonet i sar., 1999; Tuzlacı i Erol, 1999; Tuzlacı i Tolon, 2000; Ballero i sar., 2001; Petlevski i sar., 2001; Sezik i sar., 2001; Tuzlacı i Aymaz, 2001; Vardhini i sar., 2001; Agelet i Vallès, 2003; Filipowicz i sar., 2003; Guarrera, 2003; Jimenez-Arellanes i sar., 2003; Gallagher i sar., 2003; Petlevski i sar., 2003; Shin, 2003; Gao i sar., 2004; Lascaratos i sar., 2004; Loi i sar., 2004; Madari i Jacobs, 2004; Mamedov i sar., 2004; Sharma i sar., 2004; Soković i sar., 2004; Al-Qura'n, 2005; Kim i Kang, 2005; Pieroni i sar., 2005; Schepetkin i sar., 2005; Topçu i sar., 2005; Cavaleiro i sar., 2006; Dob i sar., 2006; Elmastaş i sar., 2006; Johnson, 2006; Kozan i sar., 2006; Kunwar i sar., 2006; El-Sawi i sar., 2007; Gautam i sar., 2007; Glišić i sar., 2007; Lans i sar., 2007; Loizzo i sar., 2007; McCune i Johns, 2007; Seca i Silva, 2007; Slambrouck i sar., 2007; Yarnell i Abascal, 2007; Abascal i Yarnell, 2008; Ju i sar., 2008; Kim i sar., 2008; Kirca i Arslan, 2008; Lans i sar., 2008; Marc i sar., 2008; Moujir i sar., 2008; Muto i sar., 2008; Pavela, 2008; Rossini i sar., 2008; Ugurlu i Secmen, 2008; Unlu i sar., 2008; Akkol i sar., 2009; Ennajar i sar., 2009; Hammami i sar., 2009; Harbilas i sar., 2009; Hayley i Palombo, 2009; Garboui i sar., 2009; Kusari, 2009; Lantto i sar., 2009; Miceli i sar., 2009; Reichling i sar., 2009; Tam i sar., 2009; Agarwal i sar., 2010; Baldea i sar., 2010; Greer i sar., 2010; Idolo i sar., 2010; Lautié i sar., 2010;

Machado i sar., 2010; Rosa i sar., 2010; Tserennadmid i sar., 2010; Webster i sar., 2010; Lesjak i sar., 2011; Orhan i sar., 2011).

Poseban značaj pridaje se istraživanjima antioksidantne aktivnosti ekstrakata i etarskih ulja kleke. U *Tabeli 2.4.* citirani su radovi koji se odnose na kapacitet „hvatanja“ DPPH[•] (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal), ABTS^{•+} (2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) radikalski katjon) i HO[•] radikala i H₂O₂, inhibiciju lipidne peroksidacije i oksidacije skvalena i heksanala, Fe²⁺ helatacionu aktivnost, koji pokazuju da ispitivane vrste roda *Juniperus* ispoljavaju značajan antioksidantni potencijal. Budući da je u većini testova ispitivana antioksidantna aktivnost različitih vrsta ekstrakata i etarskih ulja, kao i da se eksperimentalni uslovi razlikuju u primenjenim testovima, nije moguće porediti antioksidantni potencijal niti okarakterisati pojedinačnu vrstu kleke kao najbolji antioksidantni agens. Ipak, na osnovu dobijenih podataka, može da se zaključi da ove vrste poseduju znatan antioksidantni potencijal i da postoji potreba za daljom karakterizacijom nedovoljno ispitanih vrsta (kao što je npr. *J. macrocarpa*), a posebno etarskih ulja, koja su, za razliku od ekstrakata, nedovoljno ispitivana sa aspekta antioksidantnog delovanja.

Tabela 2.4. Pregled podataka iz literature o antioksidantnoj aktivnosti odabranih vrsta roda *Juniperus*

Vrsta iglice/šišarke ekstrakt/etarsko ulje		Test	Referenca
<i>J. communis</i>	iglice ekstrakt	Određivanje ukupnog redukcionog potencijala, inhibicije lipidne peroksidacije, helatacione moći, kapaciteta „hvatanja“ DPPH [•] , ABTS ^{•+} i OH [•] radikala.	Hinneburg i sar., 2006; Al-Mustafa i Al-Thunibat, 2008
	ekstrakt	Određivanje ukupnog redukcionog potencijala, inhibicije lipidne peroksidacije, helatacione moći, kapaciteta „hvatanja“ O ₂ ^{•-} , DPPH [•] i OH [•] radikala i H ₂ O ₂ .	Elmastaş i sar., 2006; Harbilas i sar., 2009; Miceli i sar., 2009
	šišarke	etarsko ulje	Određivanje kapaciteta „hvatanja“ DPPH [•] i inhibicije oksidacije skvalena i heksanala.
<i>J. excelsa</i>	iglice ekstrakt	Određivanje ukupnog redukcionog potencijala i inhibicije lipidne peroksidacije.	Emami i sar., 2007;
	etarsko ulje	Određivanje „hvatanja“ DPPH [•] radikala.	Moein i sar., 2010
	šišarke ekstrakt	Određivanje ukupnog redukcionog potencijala i inhibicije lipidne peroksidacije.	Emami i sar., 2007

<i>J. sibirica</i>	šišarke	ekstrakt	Određivanje ukupnog redukcionog potencijala, inhibicije lipidne peroksidacije, helatacione moći, kapaciteta „hvatanja“ DPPH' radikala.	Miceli i sar., 2009
<i>J. foetidissima</i>	iglice	ekstrakt	Određivanje ukupnog redukcionog potencijala i inhibicije lipidne peroksidacije.	Emami i sar., 2007
	šišarke	ekstrakt	Određivanje ukupnog redukcionog potencijala i inhibicije lipidne peroksidacije.	Emami i sar., 2007
<i>J. oxycedrus</i>	iglice	ekstrakt	Određivanje inhibicije lipidne peroksidacije u jetri i bubrezima pacova.	Orhan i sar., 2011
	šišarke	ekstrakt	Određivanje inhibicije lipidne peroksidacije u jetri i bubrezima pacova.	Orhan i sar., 2011
		etarsko ulje		Određivanje kapaciteta „hvatanja“ DPPH' radikala.
<i>J. sabina</i>	iglice	ekstrakt	Određivanje ukupnog redukcionog potencijala i inhibicije lipidne peroksidacije.	Emami i sar., 2007
	šišarke	ekstrakt	Određivanje ukupnog redukcionog potencijala i inhibicije lipidne peroksidacije.	Emami i sar., 2007
<i>J. phoenicea</i>	iglice	ekstrakt	Određivanje kapaciteta „hvatanja“ DPPH' i ABTS ^{•+} radikala.	Ennajar i sar., 2009
		etarsko ulje	Određivanje kapaciteta „hvatanja“ DPPH', ABTS ^{•+} radikala.	Ennajar i sar., 2009
	šišarke	ekstrakt	Određivanje kapaciteta „hvatanja“ DPPH' i ABTS ^{•+} radikala.	Hayouni i sar., 2007; Ennajar i sar., 2009
		etarsko ulje	Određivanje kapaciteta „hvatanja“ DPPH' i ABTS ^{•+} radikala.	Ennajar i sar., 2009

Iako su u narodu, kako ekstrakti tako i etarska ulja dobijeni iz različitih vrsta kleke, poznate kao potentni antiinflamatorni agensi, ne postoji dovoljno podataka u literaturi koji mogu da potvrde njihov antiinflamatorni potencijal. Antiinflamatorne aktivnosti vrsta *J. macrocarpa*, *J. excelsa*, *J. foetidissima* i *J. sabina* nisu do sada ispitivane. U većini dostupnih radova, za određivanje antiinflamatornih aktivnosti primenjeni su invazivni *in vivo* testovi, iako svetski trendovi preporučuju izbegavanje korišćenja eksperimentalnih životinja u te svrhe. Pregled referenci, koje potvrđuju antiinflamatornu aktivnost vrsta kleke koje su ispitivane u ovoj tezi, dat je u *Tabeli 2.5*.

Tabela 2.5. Pregled podataka iz literature o antiinflamatornoj aktivnosti odabranih vrsta roda *Juniperus*

Vrsta iglice/šišarke ekstrakt/etarsko ulje		Test	Referenca
<i>J. communis</i>	iglice ekstrakt	Karaginan-indukovani edem u zadnjoj šapi miša i pacova. PGE ₂ -indukovani edem u zadnjoj šapi miša. Pamukom-indukovani granulom kod pacova.	Chatterjee i sar., 1991; Akkol i sar., 2009
	ekstrakt	Karaginan-indukovani edem u zadnjoj šapi miša. PGE ₂ -indukovani edem u zadnjoj šapi miša. <i>In vitro</i> inhibicija metabolizma arahidonske kiseline (¹⁴ C-arahidonska kiselina) u mikrozomima govedih seminalnih vezikula.	Tunón i sar., 1995; Schneider i sar., 2004; Akkol i sar., 2009
	šišarke	<i>Ex vivo</i> inhibicija indukovane PAF-egzocitoze u humanim neutrofilima. <i>In vivo</i> inhibicija 12-LOX u humanim trombocitima.	
	etarsko ulje	<i>In vivo</i> inhibicija/aktivacija produkcije PGE ₂ , 6-keto-PGF _{1α} , TXB ₂ , TNF-α, IL-6 i IL-10 indukovane sa LPS u miševima. <i>Ex vivo</i> inhibicija produkcije TNF-α u humanim neutrofilima. <i>In vitro</i> inhibicija 15-LOX iz semena soje.	Chavali i sar., 1998; Abe i sar., 2003, Wei i Shibamoto, 2010
<i>J. sibirica</i>	iglice ekstrakt	Karaginan-indukovani edem u zadnjoj šapi miša. PGE ₂ -indukovani edem u zadnjoj šapi miša. IL-1 indukovana aktivacija Nf-κB (<i>Nuclear Factor-kappa B</i>) i produkcija NO u humanim hondrocitima.	Akkol i sar., 2009; Neves i sar., 2010
	šišarke ekstrakt	Karaginan-indukovani edem u zadnjoj šapi miša. PGE ₂ -indukovani edem u zadnjoj šapi miša. IL-1 indukovana aktivacija Nf-κB i produkcija NO u humanim hondrocitima.	Akkol i sar., 2009; Neves i sar., 2010
<i>J. oxycedrus</i>	iglice ekstrakt	Karaginan-indukovani edem u zadnjoj šapi pacova i miša. PGE ₂ -indukovani edem u zadnjoj šapi miša.	Moreno i sar., 1998; Akkol i sar., 2009
	šišarke ekstrakt	Karaginan-indukovani edem u zadnjoj šapi miša. PGE ₂ -indukovani edem u zadnjoj šapi miša.	Akkol i sar., 2009
<i>J. phoenicea</i>	iglice etarsko ulje	Izolovana <i>sandaracopimaric</i> kiselina. <i>In vitro</i> inhibicija 15-LOX iz semena soje	Comte i sar., 1995

Etarska ulja kleke poznata su po svom antimikrobnom delovanju na veliki broj bakterijskih sojeva, kako na Gram pozitivne tako i na Gram negativne bakterije. O tome

svedoči i veliki broj publikovanih radova. Međutim, kao i u prethodnim slučajevima, za vrste *J. macrocarpa*, *J. sibirica*, *J. foetidissima* i *J. sabina* nisu nađeni dostupni podaci u literaturi o antimikrobnom delovanju etarskih ulja i ekstrakata. Pregled referenci, koje potvrđuju antimikrobnu aktivnost etarskih ulja iglica i šišarki vrsta kleke koje su ispitivane u ovoj tezi, dat je u Tabeli 2.6.

Tabela 2.6. Pregled podataka u literaturi o antimikrobnoj aktivnosti etarskih ulja vrsta roda *Juniperus*

Vrsta iglice/šišarke etarsko ulje	Vrsta bakterije	Referenca
<i>J. communis</i>	iglice <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Angioni i sar., 2003; Bergonzelli i sar., 2003; Jimenez-Arellanes i sar., 2003; Hayley i Palombo, 2009
	šišarke <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Chromobacterium violaceum</i> , <i>Corynebacterium spp.</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterobacter cloace</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus spp.</i>	Nelson, 1997; Angioni i sar., 2003; Filipowicz i sar., 2003; Ohno i sar., 2003; Gavini i sar., 2005; Mahady i sar., 2005; Schelz i sar., 2006; Glišić i sar., 2007; Szabó i sar, 2010; Tserennadmid i sar., 2010
<i>J. excelsa</i>	iglice <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Mycobacterium chelonae</i> , <i>Mycobacterium intracellulare</i> , <i>Mycobacterium smegmatis</i> , <i>Mycobacterium xenopi</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus durans</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Muhammad i sar., 1992; Moein i sar., 2010
	šišarke <i>Acinetobacter lwoffii</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Listeria ivanovii</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Mycobacterium smegmatis</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i>	Unlu i sar., 2008
<i>J. oxycedrus</i>	iglice <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Stassi i sar., 1996; Angioni i sar., 2003; Marongiu i sar., 2003
	šišarke <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Stassi i sar., 1996; Angioni i sar., 2003; Marongiu i sar., 2003

<i>J. phoenicea</i>	iglice	<i>Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Enterococcus faecalis, Escherchia coli, Klebsiella pneumoniae, Listeria monocytogenes Scott, Micrococcus luteus, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Staph. intermedius, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus mutans</i>	Stassi i sar., 1996; El-Sawi i sar., 2007; Medini i sar., 2008; Ennajjar i sar., 2009; Derwich i sar., 2010a; Mazari i sar., 2010
	šišarke	<i>Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Escherchia coli, Klebsiella pneumonia, Listeria monocytogenes, Micrococcus luteus, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis</i>	Stassi i sar., 1996; El-Sawi i sar., 2007; Ennajjar i sar., 2009

Pored primene u fitoterapiji, vrste roda *Juniperus* nalaze široku primenu i u prehrambenoj industriji, proizvodnji alkoholnih pića, kozmetici i dr. Široko se primenjuju u kulinarstvu, prvenstveno kao začini i arome. Kao dodatak jelima, kleka daje prijatan gorko-sladak, jak i oštar ukus borovine, a najviše se koristi kod pripreme divljači i masne hrane. Takođe, kleka se koristi kao dodatak u pripremi marinada za jela od govedine, svinjetine, guščetine, jagnjetine i ribe. Kao začin, šišarke kleke koriste se u pripremi kivanog kupusa „bigos“ i tradicionalne kobasice „kiełbasa jałowcowa“ u Poljskoj (*The Silver Spoon*, 2005; Łuczaj i Szymański, 2007; Hamyl, 2009; MacMillan, 2010). Šišarke *J. drupacea* Labill. u Turskoj se koriste kao glavni sastojak tradicionalnog „enek“ pekmeza (Semiz i sar., 2007; Miceli i sar., 2009).

Vrste roda *Juniperus* koriste se i u industriji alkoholnih pića, od kojih je u svetu najpoznatiji džin, gde se šišarke kleke *J. communis* koriste za dobijanje karakteristične gorke arome. U džinu, detektovani su diterpenoidi, prvenstveno manool, dihidroabietal, totarol, feruginol i dr., koji potiču od šišarki *J. communis* i koji su odgovorni za karakterističnu aromu (Greer i sar., 2008; Vichi i sar., 2008; Miceli i sar., 2009). Pored džina, širom sveta proizvode se tradicionalna alkoholna pića na bazi arome šišarki kleke, koja su karakteristična za podneblja odakle dolaze. Poznata su žestoka pića: „Geneva“ (Holandija), „Steinhäger“ (Nemačka), „Borovička“ (Češka Republika), „Sahti“ (Finska) i „Brinjevec“ (Slovenija) kao i tradicionalni italijanski aperitivi „Grappa“ i „Gineprino“, poljsko pivo „Kozicowe“ i grčko vino „Hippocras“, piće koje je prvi izmislio Hipokrat, kod kojeg se u pripremi vino kuva sa šišarkama kleke (Guarrera, 2003; Veljković i Stanković, 2003; Innocenti i sar., 2007; Łuczaj i Szymański, 2007; Vichi i sar., 2007; Hamyl, 2009; Meusinger, 2009). U Srbiji, najpoznatije piće na bazi kleke je rakija „Klekovača“. Zanimljivo je i to da su neke vrste kleke našle

primenu u proizvodnji hrane kao konzervansi, zbog svojih antimikrobnih aktivnosti (Mrabet i sar., 2008).

Vrste roda *Juniperus* našle su široku primenu i u kozmetičkoj industriji. Etarska ulja raznih vrsta kleke koriste se kao mirisna komponenta u proizvodnji sapuna, deterdženata, krema, losiona i parfema. Dokazano je da mirisne komponente etarskog ulja kleke imaju pozitivan uticaj na moždane funkcije i čulo sluha, pa se koriste i u aromaterapiji (Leung i Foster, 1996; Sugawara i sar., 1999; Miceli i sar., 2009).

Interesantno je i to da neke divlje i domaće životinje (jelen, los, divlja svinja, konj, ovca, koza i dr.) u nedostatku hrane konzumiraju iglice i šišarke kleke, čija energetska i nutritivna vrednost potiče od proteina, lipida, fenolnih i terpenoidnih komponenata (Pritz i sar., 1997; Shipley i sar., 1998; Rogosic i sar., 2006; Thomas i sar., 2007; Waldron i sar., 2009).

Međutim, i pored mnogobrojnih lekovitih svojstava, neke vrste roda *Juniperus* imaju i toksičan efekat. Postoje podaci u literaturi koji potvrđuju hepatotoksična, nefrotoksična i citotoksična svojstva raznih vrsta kleke, kako na ljudski organizam, tako i na organizam životinja koje ga konzumiraju, kod kojih mogu da imaju i letalan efekat. Polen nekoliko vrsta kleke okarakterisan je kao potentan alergen, npr. *J. ashei*, *J. sabina*, zbog podofilotoksina koji se nalazi u šiškarkama ove vrste, poznata je po svojim nefrotoksičnim svojstvima. Međutim, derivati podofilotoksina i deoksipodofilotoksina, koji su prisutni u ovoj vrsti, su potentni antikancerogeni agensi koji pokazuju neselektivnu citotoksičnu aktivnost na zdrave ćelije (Hartwell i sar., 1953; Iacovacci i sar., 1998; Whiting i sar., 2002; Thomas i sar., 2007; Yarnell i Abascal, 2007; Shokrzadeh i sar., 2010).

2.2. Slobodni radikali i oksidativni stres

Po osnovnoj definiciji, slobodni radikali su atomi, joni ili molekuli, koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi, a mogu nastati transferom jednog elektrona na neradikalnu vrstu ili homolitičkim raskidanjem kovalentne veze (Cadenas i Davies, 2000). Nespareni elektron slobodnoradikalne vrste može da se nalazi na C-atomu, kao kod alkil radikala ($\cdot\text{CH}_3$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\cdot$), na O-atomu, kao kod alkoksil-, hidroksil-, peroksil- i superoksid anjon radikala ($\text{RO}\cdot$, $\text{HO}\cdot$, $\text{ROO}\cdot$, $\text{O}_2\cdot^-$), na N-atomu, kao kod azotmonoksidnog radikala ($\text{NO}\cdot$) ili na S-atomu, kao kod tiol radikala ($\text{RS}\cdot$). Nespareni elektron imaju i atom vodonika

(H[•]) i halogena (Cl[•]), alkalni metali (Na[•]), kao i neki joni metala (Cu²⁺, Fe³⁺). Takođe, slobodni radikali mogu biti neutralni, ali i pozitivno (radikal katjon) i negativno (radikal anjon) naelektrisani. Opšti termin reaktivne vrste kiseonika (*reactive oxygen species*, ROS) obuhvata kiseonikove radikale i određene neradikalne vrste koje su oksidativna sredstva i/ili se lako prevode u radikale: HOCl, HOBr, O₃, ONOO⁻, ¹O₂, H₂O₂. Međutim, pored ROS, značajnu grupu slobodnoradikalnih jedinjenja čine i reaktivne vrste hlora (*reactive chlorine species*, RCS), broma (*reactive bromine species*, RBS) i azota (*reactive nitrogen species*, RNS), čiji pregled je prikazan u Tabeli 2.7. Pojam reaktivne vrste predstavlja opšti termin koji objedinjuje ROS, RNS i reaktivne vrste sumpora i halogena. Iako svi kiseonični radikali jesu ROS, svi ROS nisu samo radikalne vrste kiseonika (Halliwell, 2006).

Tabela 2.7. Nomenklatura reaktivnih slobodnoradikalnih i neradikalnih vrsta

Slobodnoradikalne vrste	Neradikalne vrste
<i>Reaktivne vrste kiseonika (ROS)</i>	
Superoksid anjon radikal, O ₂ ^{•-}	Vodonik peroksid, H ₂ O ₂
Hidroksil radikal, HO [•]	Hipobromna kiselina, HOBr
Hidroperoksid radikal, HO ₂ [•]	Hipohlorna kiselina, HOCl
Peroksid radikal, RO ₂ [•]	Ozon, O ₃
Alkoksil radikal, RO [•]	Singletni kiseonik, ¹ Δg O ₂
Karbonatni radikal, CO ₃ ^{•-}	Organski peroksidi, ROOH
Ugljendioksidni radikal, CO ₂ ^{•-}	Peroksinitrit, ONOO
Singletni kiseonik, ¹ Σg ⁺ O ₂	Peroksinitritna kiselina, ONOOH
<i>Reaktivne vrste hlora (RCS)</i>	
Atomski hlor, Cl [•]	Hipohlorna kiselina, HOCl
	Nitril (nitronijum) hlorid, NO ₂ Cl
	Hloramini
	Hlor (gas), Cl ₂
	Brom hlorid, BrCl
	Hlor(IV) oksid, ClO ₂
<i>Reaktivne vrste broma (RBS)</i>	
Atomski brom, Br [•]	Hipobromna kiselina, HOBr
	Brom (gas), Br ₂
	Brom hlorid, BrCl
<i>Reaktivne vrste azota (RNS)</i>	
Azotmonoksidni radikal, NO [•]	Nitritna kiselina, HNO ₂
Azotdioksidni radikal, NO ₂ [•]	Nitrozil katjon, NO ⁺
Nitratni radikal, NO ₃ [•]	Nitrozil anjon, NO ⁻
	Azot(III)-oksid, N ₂ O ₃
	Azot(IV)-oksid, N ₂ O ₄
	Peroksinitrit, ONOO ⁻

Peroksinitrat, O_2NOO^-
Peroksinitritna kiselina, $ONOOH$
Nitronijum katjon, NO^{2+}
Alkilperoksinitriti, $ROONO$
Alkilperoksinitrati, RO_2ONO
Nitronijum hlorid, NO_2Cl

Reaktivne vrste kiseonika i azota, kao endogeni intermedijeri, koji neprekidno nastaju u živim ćelijama, imaju esencijalnu ulogu u regulaciji fizioloških procesa. Oni su jedinjenja koja učestvuju u signalizaciji ćelijskih funkcija kao što su proliferacija, inflamacija i adhezija. Neke ROS učestvuju u proizvodnji energije, fagocitozi, regulaciji ćelijskog rasta, signalizaciji ćelijskih funkcija i sintezi biološki važnih jedinjenja. Mnoge biološke aktivnosti npr. azot(II)-oksida posledica su upravo njegove radikalske prirode.

Slobodni radikali reaguju sa neradikalnim vrstama na nekoliko načina: mogu da se adiraju na drugi molekul i izazovu njegovo oštećenje, mogu da budu redukujući (doniranje jednog elektrona) ili oksidativni (abstrakcija jednog elektrona) agensi ili mogu da abstrahuju proton, pri čemu su proizvodi ovih reakcija nove radikalske vrste, čime zapravo započinje lančana reakcija. U pogledu bioloških sistema, poznato je da ROS mogu da „napadaju“ lipide ćelijskih membrana, proteine tkiva ili enzime, ugljene hidrate i DNK, da uzrokuju oksidaciju i time izazovu oštećenja membrana, DNK i modifikuju proteine (Pietta i sar., 1998).

Kod zdravih aerobnih organizama, produkcija slobodnoradikalnih vrsta je u stalnoj ravnoteži sa antioksidantnim odbrambenim sistemom. Iako slobodni radikali imaju značajnu ulogu u nizu fizioloških procesa, poremećaj balansa između ovih reaktivnih vrsta i antioksidantnog sistema može da dovede do ozbiljnog narušavanja normalne homeostaze ćelije. Naime, narušavanje oksido-reduktivne ravnoteže usled povišenog nivoa slobodnih radikala, uz visok stepen njihove neselektivne reaktivnosti i nestabilnosti, čiji uzrok su nespareni elektroni, dovodi do stanja oksidativnog stresa. Kao posledica oksidativnog stresa javljaju se tzv. oksidativna oštećenja, koja se izražavaju kroz različita patološka stanja.

Uopšteno, oksidativni stres može da bude prouzrokovan povišenim nivoom slobodnih radikala, koji može biti posledica povećanog izlaganja kiseoniku, prisustva toksina koji proizvode ROS, inflamatornih procesa i sl. ili inhibirane funkcije antioksidantnog sistema, koja se javlja pri npr. smanjenju aktivnosti enzima glutation peroksidaze, superoksid dismutaze i sl. Oksidativni stres može da se manifestuje kroz različite odgovore ćelija, kao

što su proliferacija i adaptacija. Proliferacija, kojom mnoge ćelije odgovaraju na umereni oksidativni stres, može biti dobra kod npr. zarastanja rana, ali loša ako vodi fibrozi tkiva. Adaptacija, koja podrazumeva pokretanje antioksidantnog odbrambenog sistema, može delimično, potpuno ili povećano da zaštiti ćeliju od ROS, a uključuje i/ili povećanje koncentracija intracelularnog Ca^{2+} i prelaznih metala koji mogu da katalizuju slobodnoradikalske reakcije. Međutim, oksidativni stres može i da izazove ozbiljna oštećenja ćelije, odnosno lipida, DNK, proteina, ugljenih hidrata i dr., što u nekim slučajevima može biti inicijalna reakcija za adaptacione procese. Takođe, oksidativno oštećenje može da izazove i starenje ćelije (ćelija preživljava, ali gubi sposobnost deobe), ali i njenu smrt. Naime, ako u ćeliji ne dođe do zamene oštećenih biomolekula, mogu da se jave trajna oksidativna oštećenja ili može da dođe do pokretanja procesa poput apoptoze ili nekroze, koji neizbežno dovode do umiranja ćelije (Halliwell i Gutteridge, 2007).

Slobodnoradikalske reaktivne vrste mogu da budu uzročnici bolesti, kao što su to npr. biološke posledice izloženosti povišenoj radijaciji ili insuficijencija seleno ili tokoferola u ishrani, ali je oksidativni stres najčešće posledica bolesti imunog sistema, ishemije, reakcija koje izazivaju lekovi ili toksini, starenja i niza uticaja koji izazivaju poremećaj funkcije jetre, srca i kardiovaskularnog sistema, crvenih krvnih zrnaca, respiratornog sistema, bubrega, nervnog sistema i dr. Uopšteno, kliničke studije pokazale su da se povišeni nivo ROS, odnosno oksidativna oštećenja koja oni izazivaju, mogu dovesti u direktnu vezu sa nizom oboljenja, poput ateroskleroze, vazospazme, bolesti bržeg starenja, kancera, reume, moždanog udara, astme, artritisa, infarkta srca, dermatitisa, kataraktogeneze, oštećenja retine, hepatitisa, oštećenje jetre i dr. (Halliwell i Gutteridge, 2007). Ishrana bogata biljkama doprinosi smanjenju rizika od razvijanja ovih bolesti, zahvaljujući mnoštvu antioksidanata (askorbat, tokoferoli, flavonoidi, karotenoidi), koji su prisutnih u njima (Halliwell, 2009).

2.2.1. Antioksidansi i određivanje antioksidantnog potencijala

Opšta definicija antioksidansa podrazumeva sve supstance, koje u koncentracijama znatno nižim od koncentracije supstrata koji može da se oksiduje, značajno smanjuju ili sprečavaju njegovu oksidaciju. U širem smislu, antioksidans je zapravo agens koji

onemogućava, sprečava ili uklanja oksidativna oštećenja ciljanog molekula (Halliwell i Gutteridge, 2007). Antioksidansi mogu da budu sintetisani *in vivo* ili uneti putem ishrane.

Uopšteno, oni se mogu podeliti u nekoliko grupa:

- Agensi koji katalitički uklanjaju reaktivne vrste (ROS, RNS, RCS), npr. superoksid dizmutaza (SOD), superoksid reduktaza, katalaza i peroksidaze
- Agensi koji utiču na smanjenje formiranja reaktivnih vrsta, poput mitohondrijalnih proteina, koji mogu da redukuju dostupnost jona koji imaju prooksidativno dejstvo (joni gvožđa ili bakra), npr. transferin, albumin, haptoglobin, hemopeksin, hemooksigenaze
- Proteini koji štite biomolekule od oksidativnog oštećenja drugim mehanizmima, npr. čaperoni
- Agensi koji poseduju „skevindžer“ aktivnost, npr. karotenoidi, fenoli, flavonoidi, terpenoidi
- Molekuli koji nisu osetljivi na oksidativna oštećenja i koji „zamenjuju“ molekule podložne oksidaciji, npr. fumaraza C u *E. coli*
- „Žrtveni agensi“, koji se preferencijalno oksiduju, da bi se sačuvali važniji biomolekuli, npr. α -tokoferol, bilirubin, askorbat, urat, albumin, plazmalogeni.

Kada se slobodni radikali formiraju *in vivo*, uloga različitih antioksidanasa zavisiće od prirode, mesta i načina generisanja reaktivne vrste, kao i od molekula koji može da bude oštećen. Na primer, urati imaju ključnu antioksidantnu ulogu pri povišenom nivou O_3 ili NO^* , a nasuprot tome, slabo štite od oštećenja plazme izazvane HOCl-om. Takođe, nivo zaštite od oksidativnog oštećenja zavisi od tipa ćelije, odnosno tkiva. Smatra se da stem ćelije imaju vrlo visok nivo antioksidantne zaštite (Dernbach i sar., 2004; Finkel, 2005), dok se odbrambeni mehanizam u ekstracelularnim tečnostima značajno razlikuje od intracelularnih. Međutim, antioksidantna zaštita može da potiče i od agenasa unetih ishranom i zato poslednjih decenija sve veći značaj imaju upravo ispitivanja antioksidantnih svojstava namirnica. Naime, ishrana bogata snažnim antioksidantnim agensima, poput askorbinske kiseline, vitamina E, karotenoida ili biljnih fenola, zahvaljujući sposobnosti ovih jedinjenja da smanjuju nivo slobodnoradikalnih vrsta, može da utiče na prevenciju, ali i da ima terapeutsko dejstvo u slučaju bolesti povezanih sa oksidativnim stresom. U cilju ispitivanja

uticaja različitih agenasa na nivo slobodnih radikala kako u hrani, tako i u biološkim sistemima, metode za određivanje neutralizacije slobodnih radikala, odnosno antioksidantnog potencijala imaju široku primenu. U pogledu ispitivanja hrane, neophodno je da se odredi efikasnost prirodnih antioksidanata pri zaštiti od oksidativnog oštećenja hrane, kao i antioksidantni kapacitet različitih biljaka. Određivanjem antioksidantnog statusa u biološkim sistemima može da se prati uticaj ishrane na oksidativni stres i doprinos u prevenciji bolesti čiji uzročnici su oksidativna oštećenja (Sánchez-Moreno, 2002).

Efikasnost antioksidanata određuje se merenjem inhibicije oksidacije odgovarajućeg supstrata. Nakon što se pod strandarnim uslovima supstrat oksiduje, stepen oksidacije (završna tačka) se meri hemijskim, instrumentalnim ili senzornim metodama. Zato su osnovni delovi svakog testa pogodan supstrat, inicijator oksidacije i odgovarajući način za merenje završne tačke. Kombinacije supstrata, inicijatora i završne tačke su mnogobrojne i sa istim analitičkim tehnikama moguće je izvesti nekoliko različitih analitičkih postupaka (Sánchez-Moreno, 2002).

Uopšteno, testovi za određivanje antioksidantnog potencijala u biološkim sistemima i namirnicama mogu biti zasnovani na:

- sposobnosti hvatanja slobodnih radikala
- transferu elektrona
- inhibiciji lipidne peroksidacije

Zbog velikog broja reaktivnih hemijskih vrsta koje narušavaju homeostazu ćelije i raznolikosti mehanizma njihovog delovanja, nemoguće je definisati jedinstveno merilo antioksidantne aktivnosti. U procesu evaluacije antioksidantnog potencijala ispitivane supstance, potrebno je izabrati kombinaciju više testova koji se zasnivaju na različitim principima i pokazuju antioksidantni potencijal ispitivane supstance putem različitih mehanizama delovanja. U *Tabeli 2.8.* navedene su neke od metoda koje mogu da se primene za određivanje antioksidantnog potencijala različitih agenasa.

Tabela 2.8. Primeri metoda za određivanje antioksidantnog potencijala u biološkim sistemima i namirnicama

Metoda	Princip
<i>Sposobnosti hvatanja slobodnih radikala</i>	
Određivanje kapaciteta hvatanja superoksid anjon radikala	merenje procenta inhibicije stvaranja $O_2^{\cdot-}$, generisanog u reakciji fenazin-metilsulfata (PMS) u prisustvu NADH i molekuskog kiseonika ili hipoksantin/ksantin-oksida sistema; praćenje: spektrofotometrijski (Sánchez-Moreno, 2002) merenje procenta inhibicije stvaranja etena u reakciji generisanog $O_2^{\cdot-}$ sa α -ketometiolbuternom kiselinom (KMB); praćenje: GC (<i>Gas Chromatography</i>) (MacDonald-Wicks i sar., 2006) „hvatanje“ generisanog $O_2^{\cdot-}$ 5,5-dimetil-1-pirolin- <i>N</i> -oksidom; praćenje: elektron spin rezonantna (ESR) spektrofotometrija (MacDonald-Wicks i sar., 2006)
Određivanje kapaciteta hvatanja hidroksil radikala	„deoksiriboza test“: merenje procenta inhibicije stvaranja malonildialdehida (MDA), nastalog oksidativnim dejstvom Fentonovom reakcijom generisanog HO^{\cdot} na deoksiribozu; praćenje: spektrofotometrijski (Sánchez-Moreno, 2002) HORAC test (<i>hydroxyl radical averting capacity</i>): merenje procenta inhibicije hidroksilacije <i>p</i> -hidroksibenzoeve kiseline HO^{\cdot} generisanim Fentonovom reakcijom sa Co^{2+} ; praćenje: HPLC-MS (<i>High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>) (MacDonald-Wicks i sar., 2006) 3D test (<i>damaged DNA detection</i>): merenje procenta inhibicije stepena oštećenja DNK izazvanog HO^{\cdot} generisanim u Fentonovoj reakciji (Sánchez-Moreno, 2002) merenje procenta inhibicije peroksidacije lipozoma ili linoleinske kiseline izazvane ROO^{\cdot} generisanim iz azo jedinjenja; praćenje: spektrofotometrijski (Sánchez-Moreno, 2002)
Određivanje kapaciteta hvatanja peroksil radikala	TRAP test (<i>total radical-trapping antioxidant parameter assay</i>): određivanje antioksidantnog statusa humane plazme praćenjem potrošnje kiseonika tokom oksidativnog procesa (generisanje ROO^{\cdot} termalnom dekompozicijom vodorastvornog azo-inicijatora) i poređenje sa Trolox-om; praćenje: spektrofotometrijski (Sánchez-Moreno, 2002; MacDonald-Wicks i sar., 2006) ORAC test (<i>oxygen radical absorbance capacity assay</i>): merenje procenta inhibicije promene fluorescencije B-fikoertrina ili fluoresceina u prisustvu azo-generatora ROO^{\cdot} ; praćenje: spektrofotometrijski (Sánchez-Moreno, 2002; MacDonald-Wicks i sar., 2006) merenje procenta inhibicije izbeljivanja karotenoida krocina u prisustvu azo-generatora ROO^{\cdot} ; praćenje: spektrofotometrijski (Sánchez-Moreno, 2002)
Određivanje kapaciteta hvatanja vodonik-peroksida	merenje procenta inhibicije skopoletin u nefluorescentni proizvod pod dejstvom peroksidaze iz rena u prisustvu H_2O_2 ; praćenje: hemiluminometrijski (Sánchez-Moreno, 2002) merenje procenta inhibicije hemiluminiscencije pobuđenog aminoftalata, nastalog u reakciji diazahinona (generisanog reakcijom luminola sa hipohloritom) sa H_2O_2 ; praćenje: hemiluminometrijski (MacDonald-Wicks i sar., 2006)
Određivanje kapaciteta hvatanja hiophlorne kiseline	merenje procenta inhibicije oslobađanje etena u sistemu mijeloperoksidaza/ H_2O_2 /NaCl u prisustvu 1-aminociklopropan-karboksilne kiseline; praćenje: GC (Sánchez-Moreno, 2002) merenje procenta inhibicije α_1 -antiproteinaze u prisustvu HOCl generisane iz natrijum hipohlorida; praćenje: spektrofotometrijski (Sánchez-Moreno, 2002)
Određivanje kapaciteta hvatanja azot(II)-oksida	merenje procenta inhibicije nitritnih jona generisanih iz vodenog rastvora natrijum-nitroprusida; praćenje: spektrofotometrijski (Green i sar., 1982)
Određivanje kapaciteta hvatanja peroksinitrita	merenje procenta inhibicije promene fluorescencije dihidrorodamina 123 u fluorescentni rodamin 123 pod dejstvom $ONOO^-$ (Sánchez-Moreno, 2002)

<i>Transfer elektrona</i>	
Određivanje neutralizacije DPPH [•] radikala	merenje procenta neutralizacije stabilnog DPPH [•] radikala; praćenje: spektrofotometrijski (Sánchez-Moreno, 2002; MacDonald-Wicks i sar., 2006)
Određivanje neutralizacije ABTS ^{•+} radikala	TEAC test (<i>trolox equivalent antioxidant capacity</i>): merenje procenta neutralizacije ABTS ^{•+} radikala, generisanog u sistemu H ₂ O ₂ /peroksidaza i poređenje sa Trolox-om; praćenje: spektrofotometrijski (Sánchez-Moreno, 2002)
Određivanje redoks potencijala	FRAP test (<i>ferric ion reducing antioxidant power</i>): merenje procenta inhibicije redukcije Fe ³⁺ -tripiridiltriazin (Fe ³⁺ -TPTZ) kompleksa do Fe ²⁺ -TPTZ; praćenje: spektrofotometrijski (MacDonald-Wicks i sar., 2006)
<i>Lipidna peroksidacija</i>	
Inhibicija lipidne peroksidacije	merenje potrošnje kiseonika; praćenje: manometrijsko, gravimetrijsko, polarografsko (Laguerre i sar., 2007)
	merenje gubitka supstrata: izbeljivanje β-karotena; praćenje: spektrofotometrijski (Laguerre i sar., 2007)
	praćenje formiranja primarnih produkata oksidacije hidroperoksida; praćenje: spektrofotometrijski (Laguerre i sar., 2007) praćenje formiranja sekundarnih produkata oksidacije malonildialdehida; praćenje: spektrofotometrijski, HPLC (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>), GC-FID (<i>Gas Chromatography-Flame Ionization Detector</i>) (Laguerre i sar., 2007)

2.3. *Inflamacija i metabolizam arahidonske kiseline*

Razvoj zapaljenske, odnosno imune reakcije u organizmu sisara posledica je odbrambenog odgovora organizma na napad patogena (izazivača bolesti). Takođe, i sam odgovor može da prouzrokuje oštećenje i da tako čini deo procesa razvoja oboljenja, koji može da vodi ka akutnom stanju, kao na primer kod astme, reumatoidnog artritisa ili ateroskleroze. Za ovakva stanja neadekvatno razvijenih zaštitnih inflamatornih i/ili imunih odgovora, namenjeni su antiinflamatorni ili imunosupresivni lekovi.

Obrana organizma od patogena posredovana je ranim reakcijama urođenog i kasnijom reakcijom adaptivnog imunog odgovora (Rang i sar., 2004):

- *Urođeni (nespecifični) imuni odgovor* se aktivira neposredno po infekciji, okreće odgovor domaćina na infektivni organizam i šalje pobuđujući signal za adaptivni imuni odgovor. Osim toga, ima ulogu u prevenciji napada i oštećenja ćelije domaćina tokom adaptivnog odgovora. Urođeni imuni odgovor aktivira se isključivo na infekcije mikroorganizama i razvija isti odgovor prilikom ponovljene infekcije. Osnovne komponente urođenog imunog odgovora su fizičke i hemijske barijere, fagocitne ćelije i ćelije prirodne ubice (NK – *Natural Killer cells*), proteini iz krvi, kao što su proteini sistema komplemenata, citokini, itd.

- *Adaptivni (stečeni, specifični) imuni odgovor*, koji se pokreće tek nakon toga što urođeni imuni odgovor prepozna patogen. On uvodi sveobuhvatan niz reakcija koje su izuzetno specifične za invazivni organizam, tačnije adaptira se prema infekciji, čineći dejstva ćelija i medijatora, koji učestvuju u urođenom odgovoru, mnogo efikasnijim. Takođe, adaptivni imuni odgovor ostavlja „memorijski zapis“ o susretu sa patogenom i nakon ponovljenog susreta reakcija na isti patogen je snažnija i brža.

Iako različiti, ova dva tipa imunog odgovora su u stalnoj interakciji: nespecifični imunitet određuje vrstu specifičnog imunološkog odgovora, dok specifični imunitet dalje usmerava i pojačava nespecifični. Nasuprot tome što su ove reakcije protektivne i imaju značaj za preživljavanje, one mogu da budu i štetne ukoliko se razvijaju na neodgovarajući način. Na primer, reakcije preosetljivosti predstavljaju neadekvatno razvijene imune reakcije. Takođe, nalaze se i u osnovi autoimunih oboljenja, tj. oboljenja uzrokovanih imunim reakcijama usmerenim prema sopstvenim tkivima domaćina.

Postoji niz medijatora inflamacije, koji u organizmu nastaju u toku patoloških procesa, a takođe su odgovorni i za normalno održavanje homeostaze. U grupu farmakološki značajnih medijatora inflamacije spadaju: histamin, eikozanoidi, leukotrieni (LT), faktor agregacije trombocita (PAF), bradikinin (BK), azot-oksidi (NO), neuropeptidi i citokini (Rang i sar., 2004; Abbas i Lichtman, 2006).

Histamin je bazni amin, deponovan u granulama mastocita i bazofila, a izlučuje se kao odgovor na lokalnu zapaljensku reakciju. Ubrizgan interdermalno, histamin izaziva: crvenilo, usled lokalne vazodilatacije, i otok, usled direktnog dejstva na krvne sudove i vazodilatacije. Glavna patofiziološka dejstva histamina su: stimulacija sekrecije gastrične kiseline (blokira se H₂-receptorskim antagonistima) i uloga medijatora u reakcijama preosetljivosti tipa I, kao što su urtikarija i visoka temperatura (blokira se H₁-receptorskim antagonistima).

Eikozanoidi nastaju iz fosfolipida dejstvom fosfolipaze A₂ (PLA₂), pri čemu se oslobađa arahidonska kiselina, koja se dalje metaboliše ili ciklooksigenaznim ili lipooksigenaznim putem do krajnjih proizvoda: prostaglandina (PG), tromboksana (TX), LT i LX. Oni su uključeni u brojne fiziološke procese i predstavljaju jedne od najvažnijih medijatora zapaljenske reakcije. Detaljan pregled njihove biosinteze i biološke aktivnosti dat je u *Poglavlju 2.3.2.*

Leukotrieni su proizvodi lipooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline. Takođe, imaju važnu ulogu u inflamatornim procesima, a detaljan pregled njihove biosinteze i biološke aktivnosti prikazan je u *Poglavlju 2.3.4.*

Faktor agregacije trombocita oslobađa se indirektno, pod uticajem (PLA₂) iz mnogih aktiviranih ćelija zapaljenja i deluje posredstvom specifičnih receptora smeštenih na različitim ciljnim ćelijama. Farmakološka dejstva PAF-a obuhvataju vazodilataciju, povećanje vaskularne permeabilnosti, hemotaksu leukocita (posebno eozinofila), aktivaciju leukocita, aktivaciju i agregaciju trombocita i spazmogeno dejstvo na glatke mišiće. PAF je medijator u mnogim tipovima zapaljenja i ima ulogu u bronhijalnoj preosetljivosti, kao i u odloženoj fazi astme.

Bradikinin je nonapeptid koji nastaje isecanjem iz kininogena, α -globulina iz plazme, pod dejstvom proteolitičkog enzima kalikreina. Enzim kinaza I transformiše ga do oktapeptida BK₁₋₈ (des-Arg-BK), koji se inaktivira pod dejstvom angiotenzin-konvertujućeg enzima u plućima. Farmakološka dejstva bradikinina su vazodilatacija (u velikom stepenu zavisna od endotela, izazvana stvaranjem azot-oksida i aktivacijom PLA₂, čime se oslobađa prostaciklin (PGI₂)), povećanje vaskularne permeabilnosti, stimulacija nervnih završetaka specijalizovanih za bol, stimulacija transporta jona i sekrecije tečnosti u epitelu pluća i gastrointestinalnog trakta, i kontrakcija glatkih mišića intestinuma i uterusa.

Azot(II)-oksid uglavnom ima proinflamatorna dejstva. U zapaljenske reakcije najčešće je uključen inducibilni oblik NO sintaze (iNOS) i skoro sve inflamatorne ćelije kao odgovor na stimulaciju citokinima eksprimiraju iNOS. NO[•] je moćan vazodilatator, povećava vaskularnu permeabilnost, kao i produkciju proinflamatornih prostaglandina. NO[•] ili supstance koje iz njega nastaju, ispoljavaju citotoksično dejstvo protiv bakterija, gljivica, virusa i metazoa, a smatra se da NO[•] unapređuje i lokalne odbrambene mehanizme. Međutim, ukoliko se stvara u preteranoj količini, može da bude štetan za ćelije domaćina. Sa druge strane, neka od njegovih dejstava su antiinflamatorna, s obzirom na to da, nakon otpuštanja iz endotelnih ćelija, on inhibira adheziju neutrofila i trombocita, kao i agregaciju trombocita.

Neuropeptidi oslobođeni iz senzornih neurona doprinose zapaljenskim reakcijama, a ovaj fenomen poznat je kao neurogena inflamacija. Glavni peptidi, koji su uključeni u ovaj proces su supstanca P, neurokinin A i CGRP (peptid srodan kalcitonin-genu, *calcitonin gene-related peptide*). Supstanca P i neurokinin A (članovi familije tahikinina) deluju na mastocite, pri

čemu se oslobađa histamin i drugi medijatori i izazivaju kontrakciju glatke muskulature i sekreciju mukusa, dok je CGRP snažan vazodilatator.

Citokini su peptidi koje oslobađaju, kao odgovor na antigen, imune i zapaljenske ćelije u imunim i zapaljenskim reakcijama, a regulišu aktivnost tih ćelija. Superfamilija citokina obuhvata interferone, brojne interleukine (IL), α -faktor nekroze tumora (TNF- α), različite faktore rasta, hemokine i faktore stimulacije rasta kolonija. Oni deluju unutar složene mreže, u kojoj ostvaruju veze između leukocita, vaskularnih endotelnih ćelija, mastocita, fibrioblasta, matičnih ćelija hematopoeze i osteoklasta, u kojoj kontrolišu proliferaciju, diferencijaciju i/ili aktivaciju ovih ćelija autokrinim (deluju na ćeliju koja ih je proizvela) ili parakrinim (deluju na ćelije u blizini) mehanizmima. Svaki citokin ima više bioloških aktivnosti (pleotropizam), a različiti tipovi ćelija mogu da eksprimiraju receptore za isti citokin. Takođe, više citokina može da ima iste ili slične biološke aktivnosti (redundantnost), odnosno različiti citokini mogu da aktiviraju iste signalne puteve. IL-1 i TNF- α su važni primarni inflamatorni citokini, jer indukuju stvaranje drugih citokina. IL-2 stimuliše proliferaciju T-ćelija. IL-4 deluje na produkciju IgE u B-ćelijama, dok IL-5 aktivira eozinofile. Interferoni α i β (IFN- α , IFN- β) imaju antivirusno dejstvo, pa se IFN- α primenjuje kao dodatak u terapiji virusnih infekcija. Važna imunoregulatorna uloga IFN- γ posledica je njegovog uticaja na aktivaciju makrofaga, a koristi se u terapiji multiple skleroze.

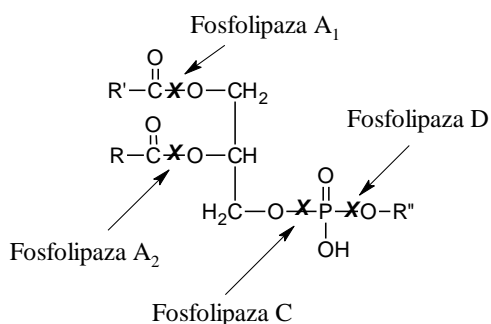
2.3.1. Arahidonska kiselina

Arahidonska kiselina (5,8,11,14-eikosatetraen-kiselina), višestruko nezasićena masna kiselina sa 20 C-atoma i četiri dvostruke veze, predstavlja najčešći zajednički metabolički prekursor grupe biološki aktivnih jedinjenja, eikozanoida, koji imaju 20 atoma ugljenika (grčki: *eicosa* - dvadeset) i tri, četiri ili pet dvostrukih veza. Arahidonska kiselina unosi se hranom ili može da nastane iz esencijalne linolenske kiseline (Koračević i sar., 1996). U ćelijama, arahidonska kiselina najčešće se nalazi u esterifikovanom obliku, ugrađena u fosfolipide membrane, zbog čega sintezi eikozanoida prethodi njeno oslobađanje iz ovih estara. Sposobnost sinteze eikozanoida imaju sve ćelije ljudskog organizma osim eritrocita, a njihovo prisustvo dokazano je i u životinjskim i u biljnim ćelijama.

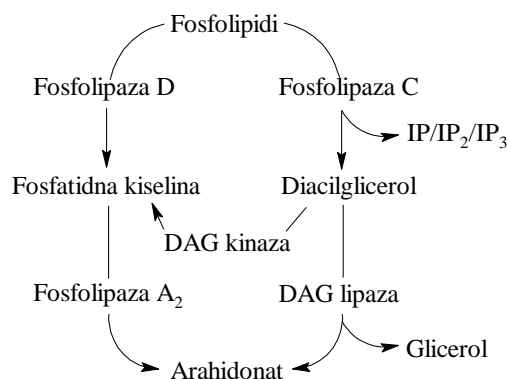
Uopšteno, veliki broj različitih fizičkih, hemijskih i hormonskih stimulusa, može da pokrene oslobađanje arahidonske kiseline, direktno ili indirektno, aktivirajući jednu od specifičnih fosfolipaza (acil-hidrolaza). Tako je, na primer, trombin stimulus za trombocite, C5a za neutrofile, bradikinin za fibroblaste, a reakcija antigen-antitelo za mastocite. Oštećenje ćelija takođe pokreće ovaj proces (Rang i sar., 2004; Abbas i Lichtman, 2006).

Smatra se da je regulacija brzine sinteze eikozanoida ostvarena upravo na nivou hidrolize estara arahidonske kiseline pod dejstvom fosfolipaza. Fosfolipaza, koja načešće katališe reakciju oslobađanja arahidonske kiseline, je intracelularna PLA₂, koja može da utiče i na stvaranje lizogliceril-fosforilholina (lizo-PAF), prekursora još jednog medijatora inflamacije, PAF-a. Zapravo, postoje tri grupe fosfolipaza A₂: sekretorne (sPLA₂), od kojih tip IIA i V učestvuju u inflamatornim procesima, celularne (cPLA₂), podeljene u pet grupa, od kojih su PLA₂-α, PLA₂-β, PLA₂-γ i iPLA₂ (kalcijum-nezavisna (*calcium-independent*) PLA₂) do sada najbolje proučene, i PLA₂ koje hidrolizuju PAF ili oksiduju fosfolipide. Pri sintezi eikozanoida, aktivacija cPLA₂ postiže se fosforilacijom cPLA₂ pomoću različitih kinaza i njenom translokacijom do membranskih fosfolipida putem kalcijum-vezujućih domena, praćenu povećanjem intracelularnog Ca²⁺, koji omogućava pristup citosolnom enzimu do membranskog supstrata (Leslie, 1997).

Hidroliza estara arahidonske kiseline može da se odigra u jedno- (*Slika 2.9.*) ili dvostepenom procesu (*Slika 2.10.*; Rang i sar., 2004).



Slika 2.9. Jednostepeno oslobađanje arahidonske kiseline iz fosfolipida (R/R' - O-acil ostatak arahidonske kiseline ili drugih masnih kiselina, R'' - holin, etanolamin, serin, inozitol ili vodonik)

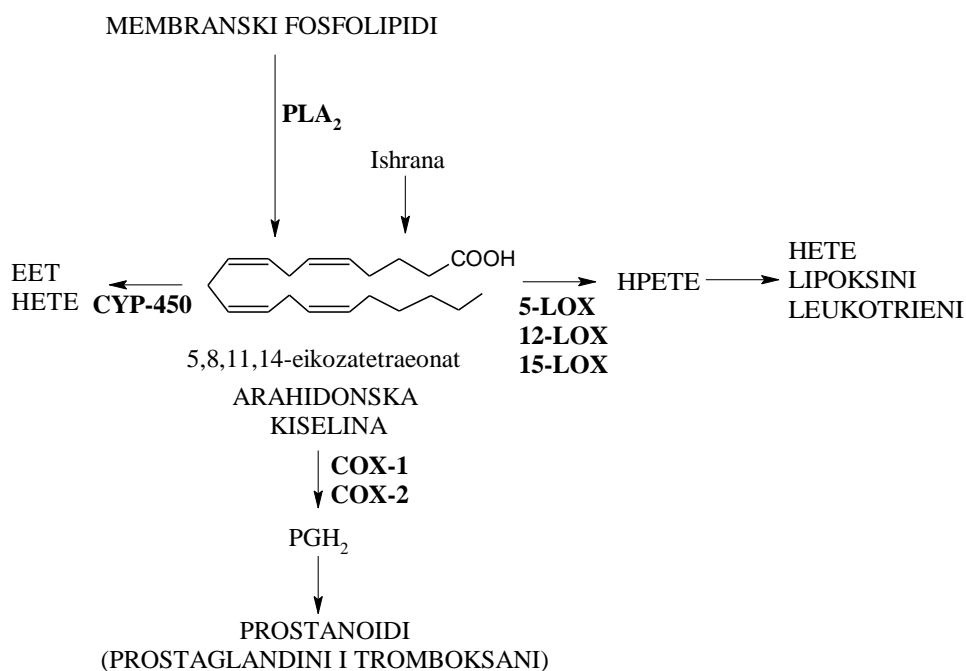


Slika 2.10. Dvostepeno oslobađanje arahidonske kiseline iz fosfolipida (IP - inozitol fosfat, DAG - diacilglicerol)

U jednostepenom procesu (*Slika 2.9.*), arahidonska kiselina, koja se najčešće nalazi u *sn*-2 položaju fosfolipida, oslobađa se direktnim dejstvom PLA₂. U dvostepenom procesu (*Slika 2.10.*), u hidrolizu fosfolipida uključene su i fosfolipaze D i C, diacilglicerol (DAG) kinaza i lipaza, kao i PLA₂. Fosfolipaza C specifično hidrolizuje fosfatidilinozitol uz nastajanje IP₃ i DAG. DAG može da se hidrolizuje pomoću diacilglicerol lipaze i odgovoran je za nastanak slobodne arahidonske kiseline. Fosfolipaza D takođe može da uzrokuje nastanak DAG preko fosfatidinske kiseline, a samim tim i slobodne arahidonske kiseline. Slobodna arahidonska kiselina dalje podleže procesu oksidacije, koji vodi ka nastajanju ključnih produkata njenog metabolizma, eikozanoida.

2.3.2. Biosinteza eikozanoida

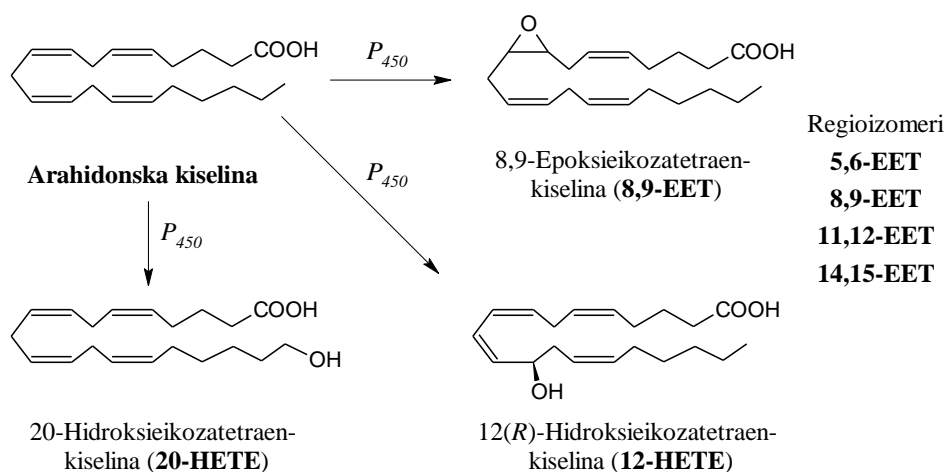
U zavisnosti od aktivnosti specifičnih enzima, metabolički put slobodne arahidonske kiseline može da se kreće u tri različita pravca, a prema nazivu ključnih enzima to su: ciklooksigenazni, lipooksigenazni i epoksigenazni put biosinteze eikozanoida (*Slika 2.11.*).



Slika 2.11. Opšta šema metabolizma slobodne arahidonske kiseline (PLA₂ - fosfolipaza A₂, CYP-450 - citohrom P450, EET - epoksieikosatrien-kiselina, HETE - hidroieikosatetraen-kiselina, COX - ciklooksigenaza, PGH₂ - prostaglandin H₂, LOX - lipooksigenaza, HPETE - hidroperoksieikosatetraen-kiselina)

Eikozanoidi, farmakološki i fiziološki medijatori koji nastaju metabolizmom arahidonske kiseline, obuhvataju četiri klase jedinjenja: PG, TX, LT i LX i imaju jednu od ključnih uloga u mnogim patološkim procesima u ljudskom organizmu. Slično hormonima, oni ispoljavaju fiziološke efekte pri veoma niskim koncentracijama, ali za razliku od mnogih drugih hormona, eikozanoidi se ne deponuju u ćelijama, već su njihova sinteza i oslobađanje trenutni, u momentu stimulacije. Eikozanoidi ispoljavaju svoj efekat na ćeliju posredstvom G-proteinskih receptora. Različiti G-proteini, aktivirani interakcijom sa odgovarajućim receptor-ligand (eikozanoid) kompleksom, utiču na koncentraciju sekundarnih „mesindžera“ (ciklični AMP, inozitoltrisfosfat (IP₃), inozitoltetrafosfat (IP₄), DAG ili Ca²⁺) ili intracelularnih jona (K⁺ ili najverovatnije Na⁺ i H⁺) tako što stimulišu ili inhibiraju adenilat ciklazu, aktiviraju fosfolipazu C, otvaraju i zatvaraju Ca²⁺ i K⁺ kanale ili utiču na Na⁺/H⁺ izmenu. Mnoštvo bioloških efekata koje ispoljavaju eikozanoidi posledica su postojanja različitih receptora, specifičnih za određeni eikozanoid, a koji se mogu kuplovati samo sa određenim G proteinom, odgovornim za odgovarajuću biološku aktivnost (Smith, 1989).

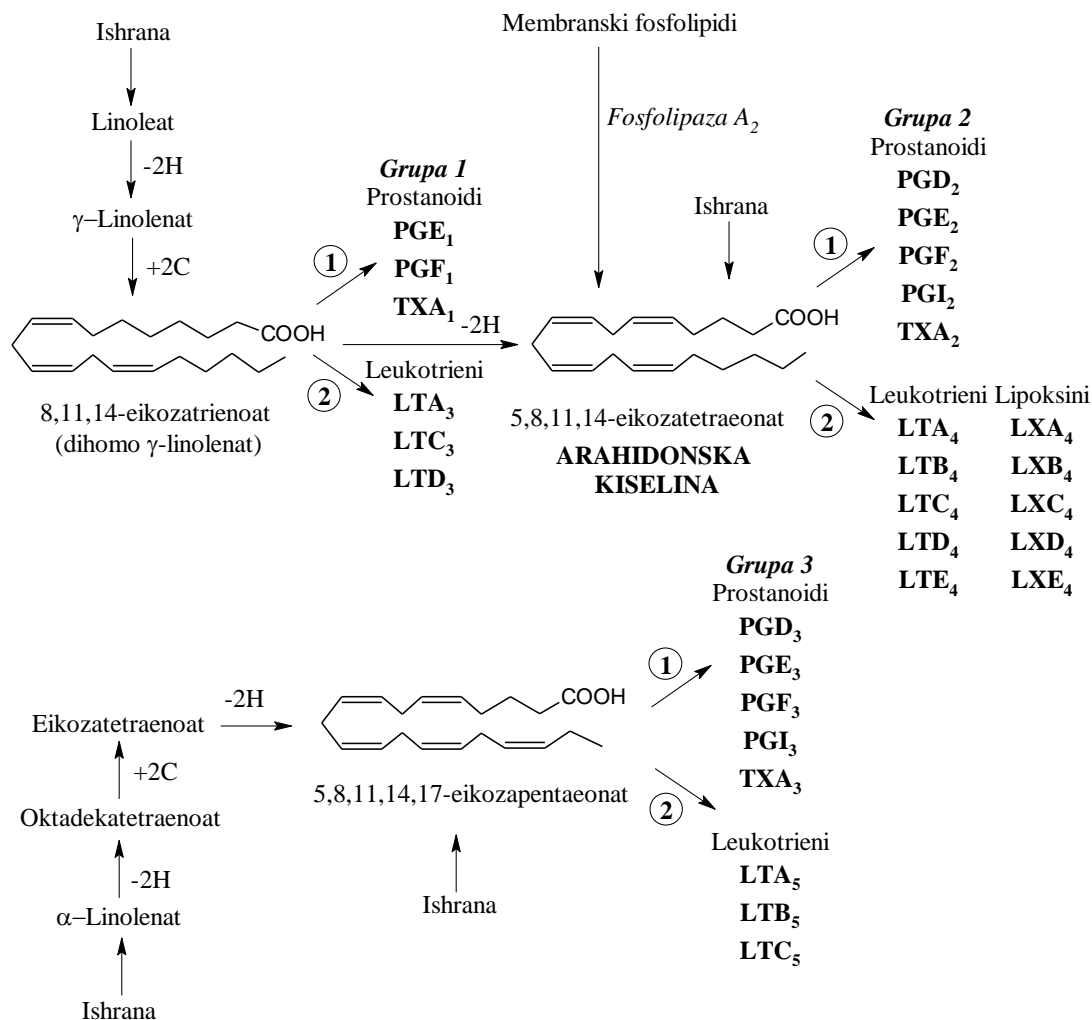
Epoksigenaznim putem metabolizma arahidonske kiseline nastaje veliki broj oksidacionih metabolita, epoksida (*Slika 2.12*. Curtis-Prior, 2004).



Slika 2.12. Biosintetski produkti dobijeni dejstvom različitih citohrom P-450 izoenzima na arahidonsku kiselinu: reakcije formiranja četiri različita regioizomera epoksieikozatetraen kiseline (EET), reakcija slična reakcijama lipooksigenaznog puta (proizvod 12(R)-HETE) i ω-oksidacija (primer: nastajanje 20-HETE).

Regioizomerne epoksieikozatrien kiseline nastaju reakcijom umetanja kiseonika u jednu od četiri dvostruke veze arahidonske kiseline, pod dejstvom monooksigenaznog enzima citohroma P-450. Nastanak ovih produkata oksidacije zavisi od aktivnosti citohroma P-450 i raspoloživog O₂ (Catella i sar., 1990). Ova jedinjenja, za razliku od prostaglandina, mogu biti inkorporisana i skladištena u fosfolipidima. Takođe, ova jedinjenja poseduju izraženu biološku aktivnost sa različitim svojstvima, odnosno mogu da mobilišu mikrozomalni kalcijum, inhibiraju transport jona, deluju na glatke mišićne ćelije, na trombocite, a smatra se i da imaju važnu ulogu u funkciji bubrega. Pored epoksida, produkti ovog puta mogu da budu i 20-hidroksi, odnosno 20-karboksi kiseline nastale ω-oksidacijom arahidonske kiseline, kao i proizvodi slični proizvodima lipooksigenaznog puta, ali suprotne stereochemije (12(R)-HETE).

U ciklooksigenaznom i lipooksigenaznom metabolizmu arahidonske kiseline nastaju tri grupe eikozanoida: *grupa 1, 2 i 3 (Slika 2.13.)*.



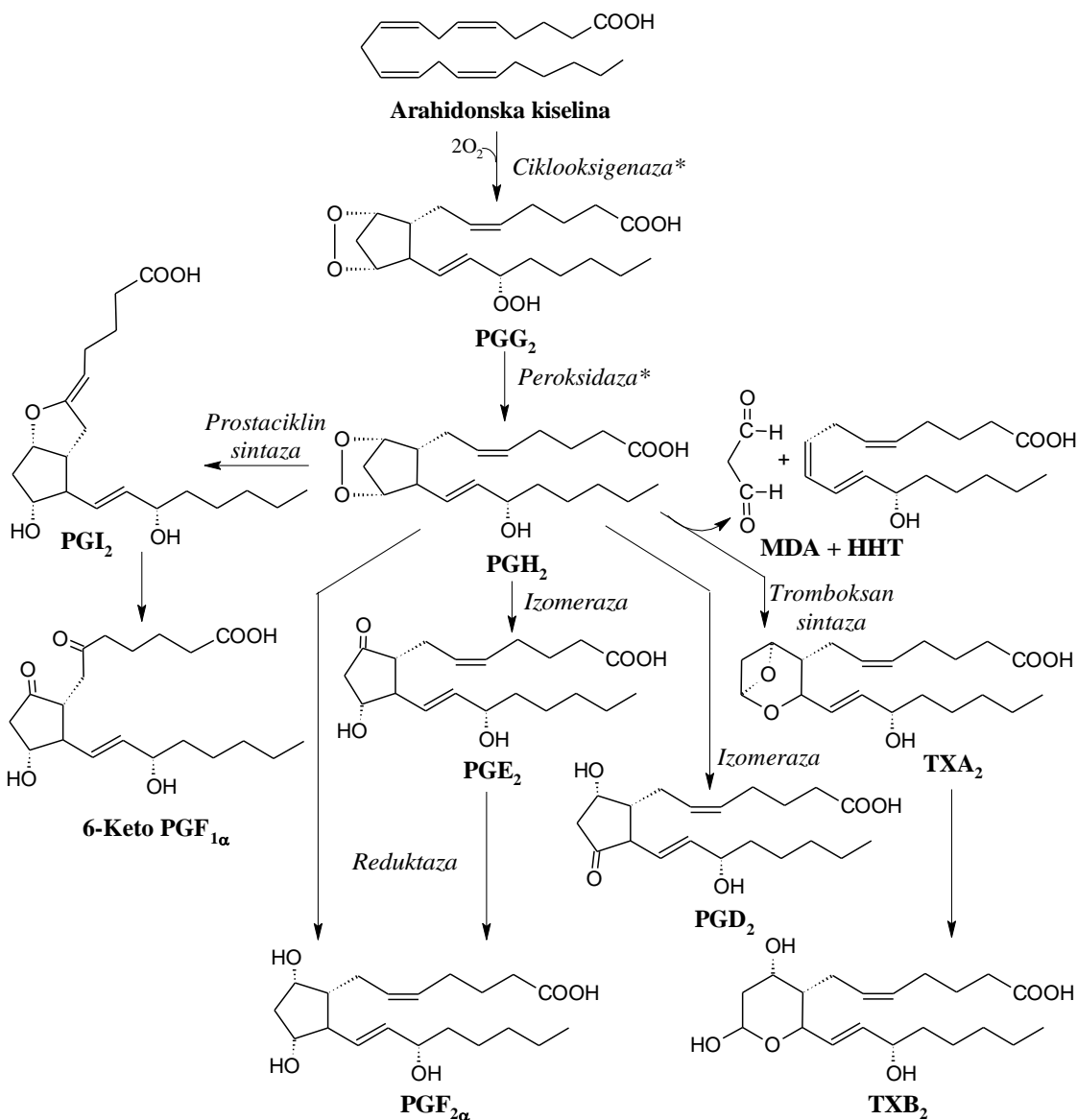
Slika 2.13. Nastajanje tri grupe eikozanoida i njihovi biosintetski prekursori (PG - prostaglandin, PGI - prostaciklin, TX - tromboksan, LT - leukotrien, LX - lipoksin; 1 - ciklooksigenazni put, 2 - lipooksigenazni put)

Biosintetski prekursori eikozanoida iz *grupa 1, 2 i 3* su esencijalne masne kiseline linoleat i α-linolenat ili direktno arahidonat i eikosapentaenoat. Sinteza PG₂ i TX₂ serije (prostanoidi; superskript označava ukupan broj dvostrukih veza u molekulu) ostvaruje se ciklooksigenaznim (1), dok se sinteza LT₄ i LX₄ serije ostvaruje lipooksigenaznim putem (2), pri čemu dolazi do kompeticije ciklo- i lipooksigenaze za arahidonatni supstrat. Slične reakcije odigravaju se i pri sintezi PG i TX iz *grupe 2 i 3* (Mayes i Botham, 2003). Primarni ciklooksigenazni produkti, poput prostaglandina serije E i F, PGI₂ i TXA₂, predstavljaju klinički najvažnije metabolite zbog mogućnosti njihove terapijske primene. Ovi metaboliti ispoljavaju najjači efekat na glatke mišiće disajnih puteva, gastrointestinalnog i

reproduktivnog sistema, kao i na vaskularnu muskulaturu. Ostale ciljne ćelije su trombociti i monociti, zatim neuroni centralnog nervnog sistema (CNS), autonomnog nervnog sistema (ANS) i senzorni nervni završeci.

2.3.3. Ciklooksigenazni put metabolizma arahidonske kiseline i fiziološka dejstva nastalih produkata

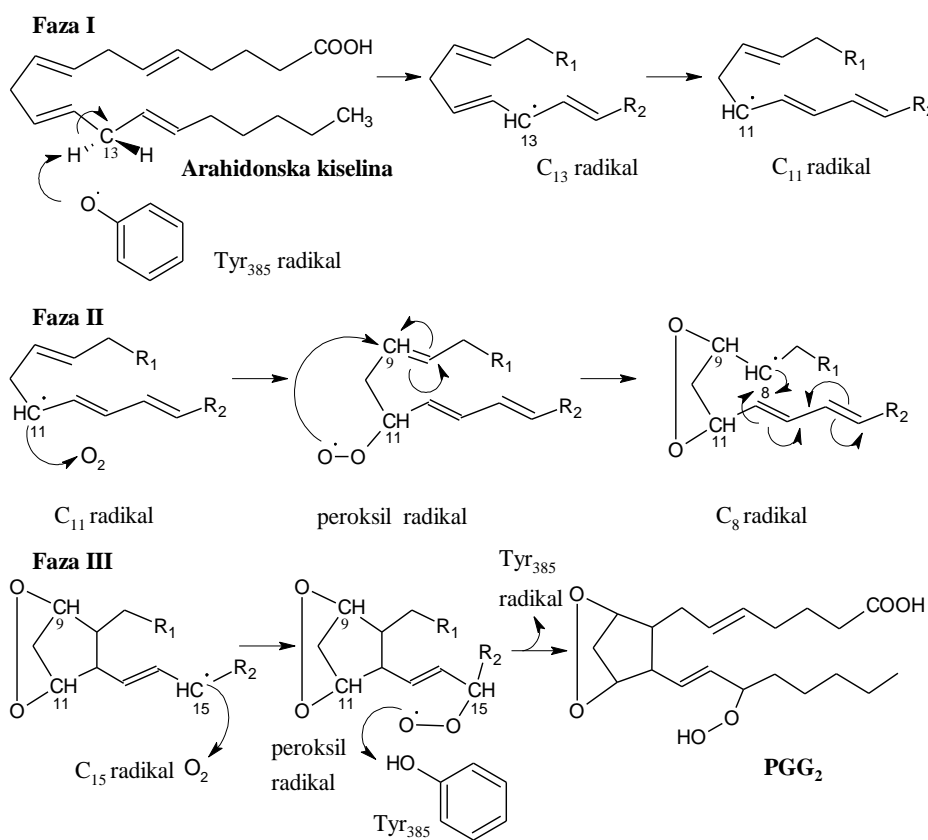
Na Slici 2.14. prikazana je opšta šema metabolizma slobodne arahidonske kiseline ciklooksigenaznim putem.



Slika 2.14. Ciklooksigenazni put biosinteze prostaglandina

(PG - prostaglandin, PGI - prostaciklin, TX - tromboksan, HHT - hidroksiheptadekatrienoat, MDA - malonildialdehid, *- aktivnost oba enzima pripisuje se dejstvu prostaglandin H sintaze)

Sinteza prostanoida (PG i TX) iz arahidonske kiseline započinje adicijom dva molekula kiseonika na arahidonsku kiselinu, a katalizovana je prostaglandin H sintazom (PGHS ili ciklooksigenaza, COX), bifunkcionalnim enzimom koji ispoljava aktivnost ciklooksigenaze i peroksidaze. Prvi stepen konverzije podrazumeva nastajanje prostaglandina G_2 , u reakciji koja se odvija slobodnoradikaliskim mehanizmomn (*Slika 2.15.*) i katalizovana je samom ciklooksigenazom, dok se dalja transformacija PGG_2 u PGH_2 vrši dvoelektronskom redukcijom posredovanom peroksidazom. U ovom procesu, dolazi i do oslobađanja slobodnih radikala, koji ireverzibilno inaktiviraju COX, uspostavljajući na taj način negativnu povratnu spregu koja reguliše sintezu endoperoksida.



Slika 2.15. Mehanizam nastajanja PGG_2

U prvoj fazi tirozil radikal uklanja H_{13} pro-*S* atom arahidonske kiseline, pri čemu nastaje C_{11} - C_{15} delokalizovani pentadienil radikal. Nastali C_{11} radikal, u drugoj fazi napada molekul kiseonika uz stvaranje peroksil radikala. Peroksil radikal dalje reaguje sa C_9 atomom formirajući cikličnu strukturu - C_8 radikal. Poslednja faza podrazumeva napad formiranog

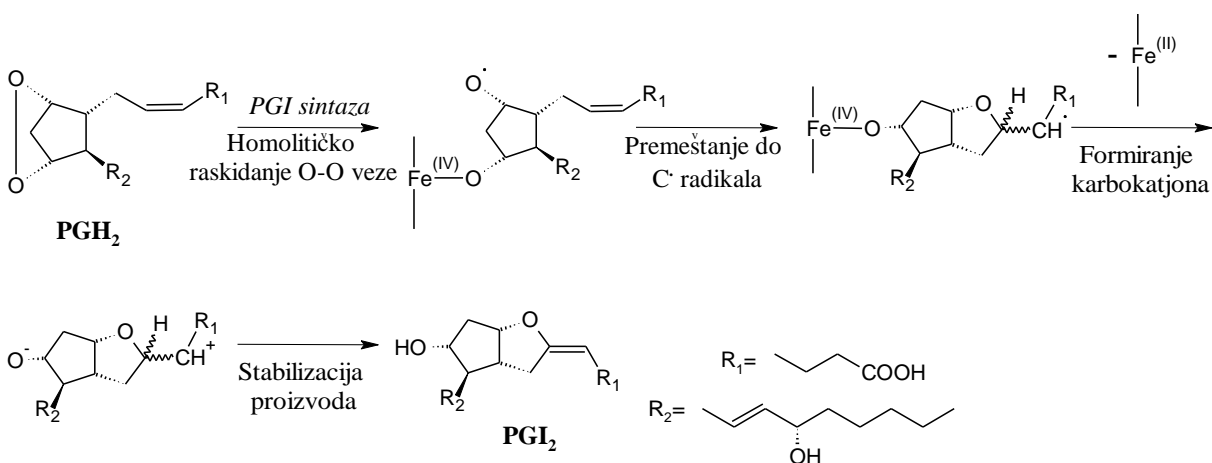
radikala na dvostruku vezu C_{12} atoma, pri čemu nastaje biciklični peroksid i novi radikal sa maksimalnom elektronskom gustinom na C_{15} atomu. Dalje, dolazi do napada na drugi atom kiseonika uz formiranje peroksil radikala koji se redukuje u PGG_2 , pri čemu se Tyr-radikal regeneriše i ponovo ulazi u reakciju (Marnett i sar., 1999).

Postoje dva izoenzimska oblika ciklooksigenaze: COX-1 i COX-2 (Pairet i Engelhardt, 1996). COX-1 sastoji se od 602, a COX-2 od 604 aminokiseline i oko 80% aminokiselinskog sastava identično je kod oba enzima, sa najizraženijim razlikama na C-, N-terminusu i heliksima u vezivnom centru. Budući da su im tercijerke strukture vrlo slične, vezivanje oba enzima za membrane endoplazmatičnog retikuluma i jedra ostvaruje se amfipatičnim heliksima koji formiraju vezivni centar. Aminokiselinska sekvenca koja je potrebna za vezivanje hema identična je kod oba izoenzima. Arahidonat se specifično vezuje za enzim u hidrofobnom kanalu, koji se nalazi u blizini vezivnog centra. COX-2 aktivni centar sadrži „bočni džep“. Ser₅₃₀ ostatak kod COX-1 analogan je Ser₅₁₆ kod COX-2 i njegovim acetilovanjem pomoću aspirina dolazi do ireverzibilne inhibicije. Takođe, ostaci Tyr₃₈₅ (COX-1) i Tyr₃₇₁ (COX-2) imaju istu funkciju i ključnu ulogu u slobodnoradikalskom mehanizmu oksigenacije arahidonske kiseline (Curtis-Prior, 2004).

COX-1 nalazi se u većini ćelija kao konstitutivni enzim (uvek je prisutan) i smatra se da su prostanoide koje on produkuje uključeni u normalnu homeostazu, kao na primer u regulaciju vaskularnog odgovora i agregaciju trombocita. U bubrezima, prostaglandini nastali dejstvom COX-1 na arahidonsku kiselinu, imaju ulogu vazodilatatora koji kontrolišu renalni protok plazme i glomerularnu filtraciju. U želucu, COX-1 ima protektivnu ulogu tako što PG utiču na protok krvi u mikrocirkulaciji gastrične mukoze, štiteći ga na taj način od ishemije, mukozalnog oštećenja i ulceritisa. Naravno, NSAIL (nesteroidni antiinflamatorni lekovi) mogu da izazovu ove patološke simptome inhibirajući COX-1 (Marks i Fürstenberg, 1999).

COX-2 indukuje se u inflamatornim ćelijama pod dejstvom inflamatornog agensa. Značajna razlika između COX-1 i COX-2 je i u sposobnosti konverzije endogene, odnosno egzogene arahidonske kiseline. Ispitivanja (Reddy i Herschman, 1994) pokazala su da COX-1 prisutna u fibroblastima i makrofagama može da metaboliše egzogeni arahidonat do PGH_2 , ali ne može endogeni. Endogena arahidonska kiselina, oslobođena iz membranskih skladišta ligand-stimulusom aktivacijom fosfolipaze, nije dostupna za COX-1, ali jeste za COX-2. Dalja konverzija PGH_2 metabolita odvija se posredstvom različitih enzima (*Slika 2.14.*).

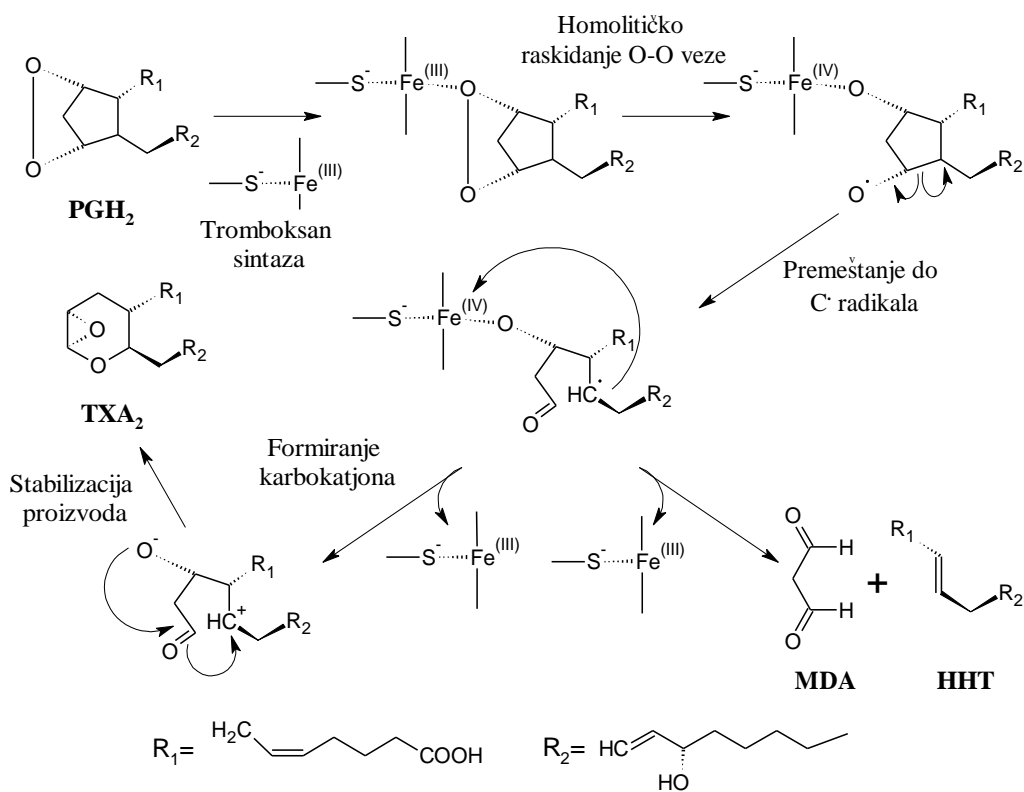
Dejstvo prostaciklin sintaze na PGH_2 vodi ka primarnom proizvodu PGI_2 . Reakcija formiranja PGI_2 obuhvata nekoliko faza: homolitičko raskidanje endoperoksidne veze u PGH_2 , katalizovano Fe(II) jonom uz nastajanje alkoksi radikala, a zatim subsekventno premeštanje do karbonil radikala, oksidaciju do karbokacija i eliminaciju protona (Slika 2.16.; Marks i Fürstenberg, 1999). Zatim, PGI_2 podleže neenzimskoj degradaciji, pri čemu nastaje neaktivni, stabilni metabolit 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ (Hecker i Ullrich, 1989).



Slika 2.16. Pretpostavljeni mehanizam nastajanja PGI_2

PGI_2 je glavni produkt arahidonske kiseline u endotelnim ćelijama i glatkim mišićima krvnih sudova. PGI_2 je snažan vazodilatator i fiziološki agonist TXA_2 , koji smanjuje periferni, pulmonalni i koronarni otpor. Intravenska, kontinuirana infuzija komercijalnog preparata prostaciklina (epoprostenol) je povoljni tretman pulmonalne hipertenzije. PGI_2 je i naj snažniji poznati endogeni inhibitor aktivacije i agregacije trombocita. Utvrđeno je da u krvi zdravih osoba postoji relativno konstantan odnos koncentracije prostaciklina i tromboksana, $\text{PGI}_2:\text{TXA}_2 = 2.5:1$. Poremećaj ovog odnosa igra važnu ulogu u patogenezi tromboembolijskih i ishemičnih kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih oboljenja. Ispitivanja na humanim fibroblastima pokazala su da se sa starenjem smanjuje stvaranje PGI_2 , dok se sinteza PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ i TXA_2 relativno povećava. Biosinteza tromboksana i prostaciklina, u fiziološkim uslovima je vrlo izbalansirana, tako da je ravnoteža u ovom delu eikozanoidnog sistema od velike važnosti za homeostazu periferne cirkulacije i kardiopulmonalnog sistema (Starčević, 1999).

Dejstvo tromboksen sintaze na PGH_2 vodi ka primarnom proizvodu TXA_2 . Slično mehanizmu nastajanja PGI_2 , formiranje TXA_2 takođe obuhvata nekoliko faza: homolitičko raskidanje endoperoksidne veze PGH_2 katalizovano Fe(II) jonom, nastajanje alkoksi radikala, jonsko premeštanje, oksidaciju do karbokacijona i eliminaciju protona. Takođe, i TXA_2 zatim podleže neenzimskoj degradaciji, pri čemu nastaje stabilan metabolit TXB_2 . Međutim, ako se elektronski transfer odigrava sporo, onda dolazi i do fragmentacije, odnosno nastajanja malondialdehida i 12(*S*)-hidroksi-(5*Z*,8*E*,10*E*)-heptadekatrien-kiseline (12-HHT) (Slika 2.17.; Marks i Fürstenberg, 1999). Simultano formiranje ovih degradacionih proizvoda kao metabolita PGH_2 , u količinama sličnim TXB_2 , dokazano je i korišćenjem izolovanog enzima (Hambeng i sar., 1974; Yokoyama i sar., 1993; Ullrich i Brugger 1994; Curtis-Prior, 2004).



Slika 2.17. Pretpostavljeni mehanizam nastajanja MDA i HHT , odnosno TXA_2

Značajno prisustvo tromboksen sintaze utvrđeno je u trombocitima, leukocitima, ali i u ćelijama slezine, pluća i jetre, dok su niže koncentracije detektovane u bubrezima, placenti i timusu. Za određivanje inhibitorne aktivnosti različitih jedinjenja, posebno je značajan 12-HHT proizvod, zato što praćenjem njegove koncentracije može direktno da se odredi COX

inhibitorni potencijal, izbegavajući eventualni uticaj antagonista na aktivnost drugih enzima (izomeraza, reduktaza, tromboksan sintaza).

Pri normalnim biološkim uslovima (pH=7.4; t=37°C), TXA₂ ima ekstremno kratak poluživot (oko 30 sekundi) i metaboliše se neenzimskom hidrolizom u stabilan derivat TXB₂. TXA₂ je jedan od najmoćnijih endogenih vazokonstriktora malih i velikih krvnih sudova, a istovremeno je i moćan faktor agregacije trombocita. Pored trombocita, receptori za TXA₂ i PGH₂ postoje i na glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova. Vezujući se za G-protein zavisne receptore, tromboksan vrši aktivaciju fosfolipaze C, što dovodi do nastanka DAG i IP₃. U citoplazmi ćelije IP₃ prazni depoe Ca²⁺, što dovodi do povećanja intracelularne koncentracije Ca²⁺. Kod trombocita, to se manifestuje aktivacijom i promocijom agregacije uz još veću produkciju TXA₂, a kod glatkih mišića nastaje snažna kontrakcija. Ovim svojim dvostrukim delovanjem u stanjima šoka razne etiologije TXA₂ produbljuje ishemiju. Primećeno je da davanje specifičnih inhibitora tromboksan sintetaze ne samo da sprečava stvaranje TXA₂, već i usmerava metabolizam arahidonske kiseline ka prostaciklinima. Međutim, farmakološka ispitivanja u cilju pronalaženja visoko selektivnog inhibitora tromboksan sintetaze nisu dala očekivane kliničke benefite, najverovatnije zbog akumulacije prekursora, PGH₂, koji ima slična svojstva i deluje preko istih receptora kao i TXA₂ (Starčević, 1999).

Prostaglandin E sintaza katalizuje izomerizaciju PGH u PGE. Uopšteno, postoje tri vrste humane PGE sintaze: mikrozomalna PGE, mikrozomalna PGE₂ i citosolna PGE₃ sintaza, a posebno bogat izvor ovog enzima predstavljaju mikrozomi semenih vezikula. PGE₁ i PGE₂ imaju izuzetno široki spektar fiziološkog dejstva. PGE₂ je moćan, ali ne i univerzalan vazodilatator, uglavnom za region mikrocirkulacije (arteriola, prekapilarnih sfinktera i postkapilarnih venula). Relaksira trahealnu i bronhijalnu muskulaturu, izaziva kontrakciju viscelarne longitudinalne muskulature (urogenitalne i gastrointestinalne), uz istovremenu relaksaciju cirkularnih mišića (sfinktera i cerviksa uteri). Značajnu ulogu ima i u fiziologiji reprodukcije, a nalazi se u semenoj tečnosti i pomaže kretanje i nidaciju oplodjenog jajeta. PGE₂ ima i natriuretski efekat. PGE₂ vrši i inhibiciju agregacije trombocita. Prisutan je u većoj koncentraciji u monocitima, a u manjoj meri i u neutrofilima. Na zrele oblike leukocita PGE₂ deluje pretežno inhibitorno: inhibira proliferaciju T i B limfocita, hemotaksiju,

agregaciju i oksidacioni metabolizam u leukocitima. Takođe, smanjuje i citotoksičnost NK ćelija i inhibira oslobađanje limfokina iz senzibilisanih T-limfocita (Starčević, 1999).

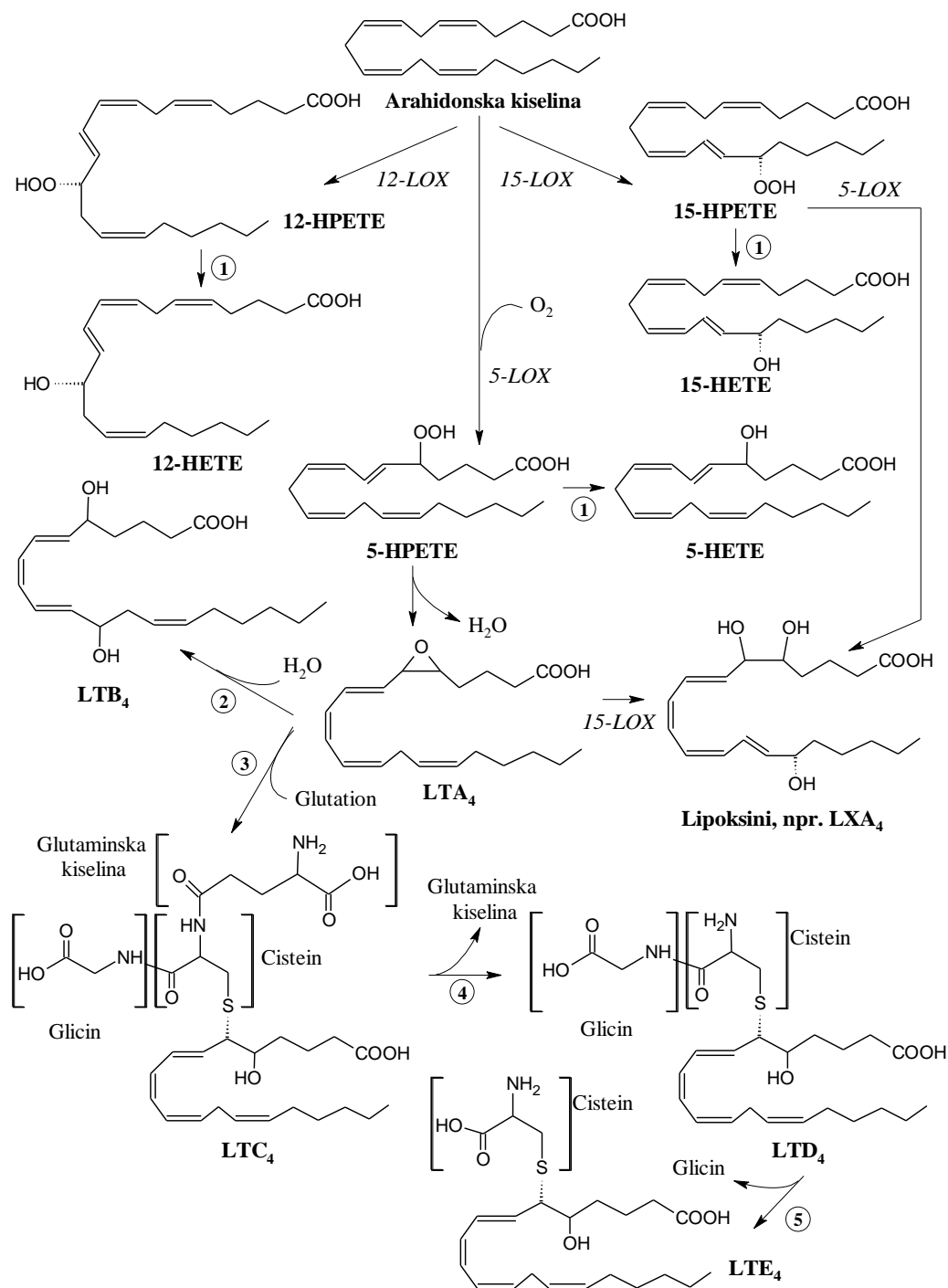
Sukcesivnom izomerizacijom i 9-keto redukcijom PGE₂ nastaje PGF_{2α}. Druga dva moguća načina sinteze PGF_{2α} podrazumevaju njegovo direktno nastajanje iz PGH₂ posredstvom reduktaze ili 11-keto redukcijom PGD₂ (Curtis-Prior, 2004.). Redukcijom endoperoksida PGH₂ ili PGD₂, nastaju 9- α , 11- β i 11-*epi* izomeri PGF_{2α}. U pogledu fiziološkog dejstva, PGF_{2α} je potentni vazokonstriktor plućnih arterija i vena. Uticaj na vaskularni tonus i drugu glatku muskulaturu je različit i zavisi od regiona. Metaboliti PGF_{2α} takođe mogu da budu vazokonstriktori i inhibitori agregacije trombocita (Kepes i Kepes, 1969).

Takođe, jedan od mogućih puteva transformacije PGH₂ podrazumeva i dejstvo prostaglandin D sintaze, pri čemu se PGH₂ transformiše do PGD₂. Postoje dve vrste prostaglandin D sintaze, prisutne u mozgu ili slezini, koje mogu da vrše ovu konverziju (Curtis-Prior, 2004.).

Uopšteno, svi primarni PG podležu brzom enzimskoj degradaciji (inaktivaciji) u skoro svim tkivima. Katabolizam prostanoida započinje oksidacijom hidroksilne grupe u položaju 15, pri čemu nastaje 15-okso derivat, koji je deset do sto puta manje aktivan nego njegov prekursor. Postoji više vrsta 15-hidroksiprostaglandin dehidrogenaza specifičnih za različite prostanoidne, a najčešće se nalaze u plućima, bubrezima i placenti. Blokiranje aktivnosti ovog enzima pomoću sulfazina ili indometahina može da produži vreme poluživota prostaglandina u telu. Nastali 15-okso produkti zatim bivaju oksidovani (beta ili omega oksidacijom) uglavnom u plućima i jetri, a u izvesnoj meri i u bubrezima. Krajnji produkti, C₁₆ dikarboksilne kiseline, ekskretuju se urinom (Smith, 1989). Takođe, prestanak delovanja prostaglandina može delimično da se postigne i putem izvanredne osobine ciklooksigenaze - samokatalizujuće destrukcije, koja ciklooksigenazu čini tzv. „samoubilačkim enzimom“ (Song i sar., 2001).

2.3.4. Lipooksigenazni putevi metabolizma arahidonske kiseline i fiziološka dejstva nastalih produkata

Na *Slici 2.18.* prikazana je šema nastajanja glavnih lipooksigenaznih metabolita (Mayes i Botham, 2003).

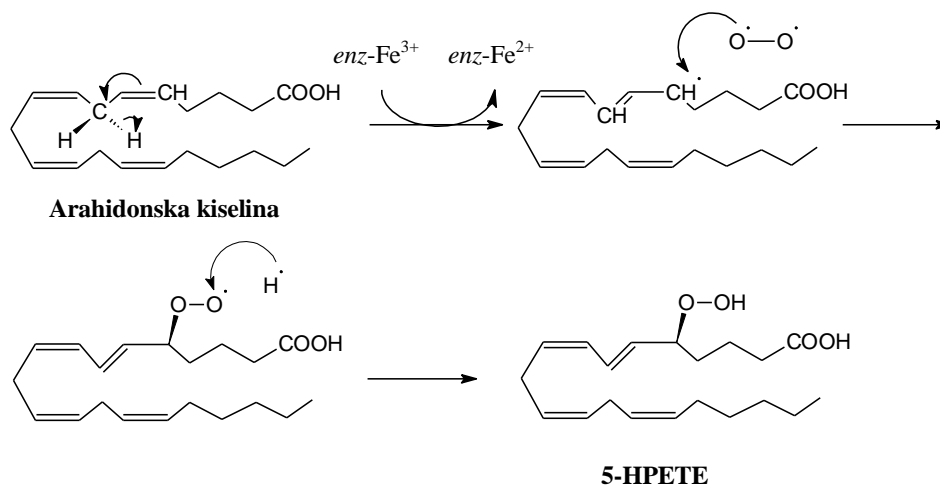


Slika 2.18. Konverzija arahidonske kiseline do leukotriena i lipoksina serije 4 (HETE - hidroksieikozatetraenoat, HPETE - hidroperoksieikozatetraenoat, LOX - lipooksigenaza, LT - leukotrien; 1 - peroksidaza, 2 - leukotrien A₄ epoksid hidrolaza, 3 - glutation S-transferaza, 4 - γ -glutamiltanspeptidaza, 5 - cisteinil-glicin dipeptidaza)

Lipooksigenazni put metabolizma arahidonske kiseline dovodi do biosinteze velikog broja produkata odgovornih za nastajanje niza alergijskih reakcija, autoimunih oboljenja i

inflamacija. Postoji više lipooksigenaza koje učestvuju u metabolizmu arahidonske kiseline, od kojih svaka nosi naziv *n*-lipooksigenaza, gde *n* predstavlja broj C atoma koji se oksiduje tj. na koji će se adirati molekul kiseonika (Curtis-Prior, 2004). Svaka od lipooksigenaza je prvi enzim u metaboličkom putu arahidonske kiseline, koji kao krajnji proizvod ima različite eikozanoide. Lipooksigenaze koje su najčešće tema naučnih ispitivanja su 5-, 12- i 15-lipooksigenaza.

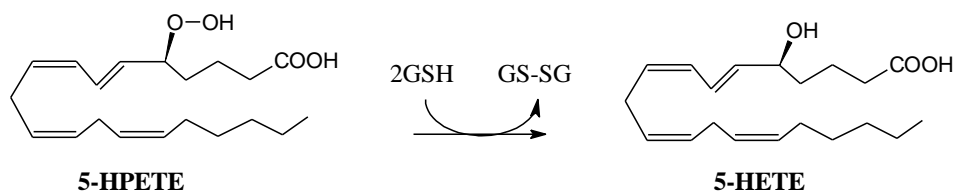
5-lipooksigenaza (5-LOX) je glavni enzim u biosintezi LT i igra važnu ulogu u patofiziologiji nastajanja alergija i inflamacije. 5-LOX je metaloenzim koji u aktivnom centru ima jon gvožđa koordinovan sa četiri histidinska ostatka. U aktivnom stanju enzima, jon gvožđa nalazi se u obliku Fe^{3+} , a u neaktivnom stanju u obliku Fe^{2+} (Curtis-Prior, 2004). 5-LOX katalizuje dve reakcije (Slika 2.18.) i to nastanak 5-hidroperoksieikosatetraen-kiseline (5-HPETE) i nastanak LTA_4 . Reakcija nastajanja 5-HPETE prikazana je na Slici 2.19. (Curtis-Prior, 2004).



Slika 2.19. Rekcija transformacije arahidonske kiseline do 5-HPETE

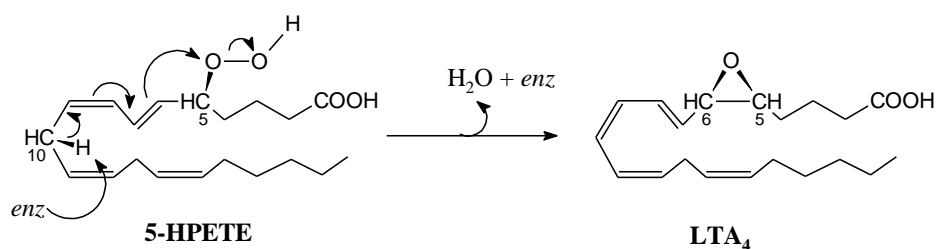
Prva faza reakcije nastajanja 5-HPETE je 5-LOX stereospecifična oksigenacija arahidonske kiseline. Do reakcije dolazi tako što enzim prvo apstrahuje *pro-S* vodonikov atom sa C_7 atoma arahidonske kiseline, pri čemu dolazi do redukcije Fe^{3+} u Fe^{2+} , a zatim vrši adiciju O_2 molekula na C_5 položaj, pri čemu nastaje 5-HPETE.

Nakon nastajanja 5-HPETE reakcija može da se nastavi u smeru biosinteze 5-hidroksieikosatetraen-kiseline (5-HETE). Ovu reakciju katalizuje enzim glutation peroksidaza i šematski je prikazana na *Slici 2.20*.



Slika 2.20. Rekcija transformacije 5-HPETE do 5-HETE

Druga reakcija 5-LOX predstavlja formiranje 5,6-epoksida uz otpuštanje molekula vode. (*Slika 2.21.*)

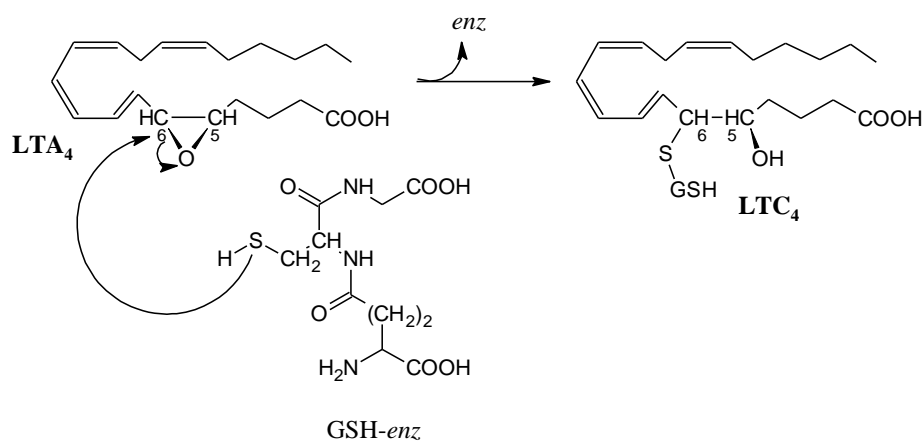


Slika 2.21. Mehanizam nastajanja LTA_4 uz pomoć 5-LOX

Ova reakcija 5-LOX se često, iako netačno, navodi i kao reakcija LTA_4 sintetaze. Reakcija počinje antrafacijalnim nukleofilnim napadom na C_{10} atom 5-HPETE, pri čemu dolazi do uklanjanja *pro-R* vodonika. Potom dolazi do kaskadnog premeštanja dvostruke veze i do formiranja 5,6-epoksida. Na kraju, oslobađa se molekul vode i nastaje izuzetno nestabilan LTA_4 (Curtis-Prior, 2004).

LTA_4 dalje može da se transformiše na tri načina i to neenzimskom i enzimskom hidrolizom, kao i reakcijom LTC_4 sintetaze. Neenzimskom hidrolizom nastaje nekoliko bioneaktivnih produkata, kao što su 5,12- i 5,6-dihidroksieikosatetraen-kiselina (5,12- i 5,6-diHETE). Enzimskom hidrolizom sa LTA_4 hidrolazom (*Slika 2.18.*) nastaje biološki aktivan LTB_4 . Ovaj enzim katalizuje stereochemijsku adiciju molekula vode na LTA_4 . Ključnu ulogu u aktivnosti ovog enzima igra jon Zn^{2+} (Thunnissen i sar., 2001). LTA_4 hidrolaza je jedini enzim sintetskog puta leukotriena koji se ne nalazi na membrani jedra.

Reakcijom LTC₄ sintetaze nastaju biološki aktivni LTC₄, LTE₄ i LTD₄. Ovi leukotrieni nazivaju se cistenil-leukotrieni ili peptidoleukotrieni, jer u svojoj strukturi sadrže molekul cisteina. LTC₄ sintetaza, koja se kao i većina enzima koji učestvuju u sintezi leukotriena nalazi na membrani jedra, omogućava adiciju molekula glutationa na C₆ atom LTA₄ pri čemu nastaje LTC₄ (Hammarström, 1983). Mehanizam nastanka LTC₄ prikazan je na Slici 2.22.



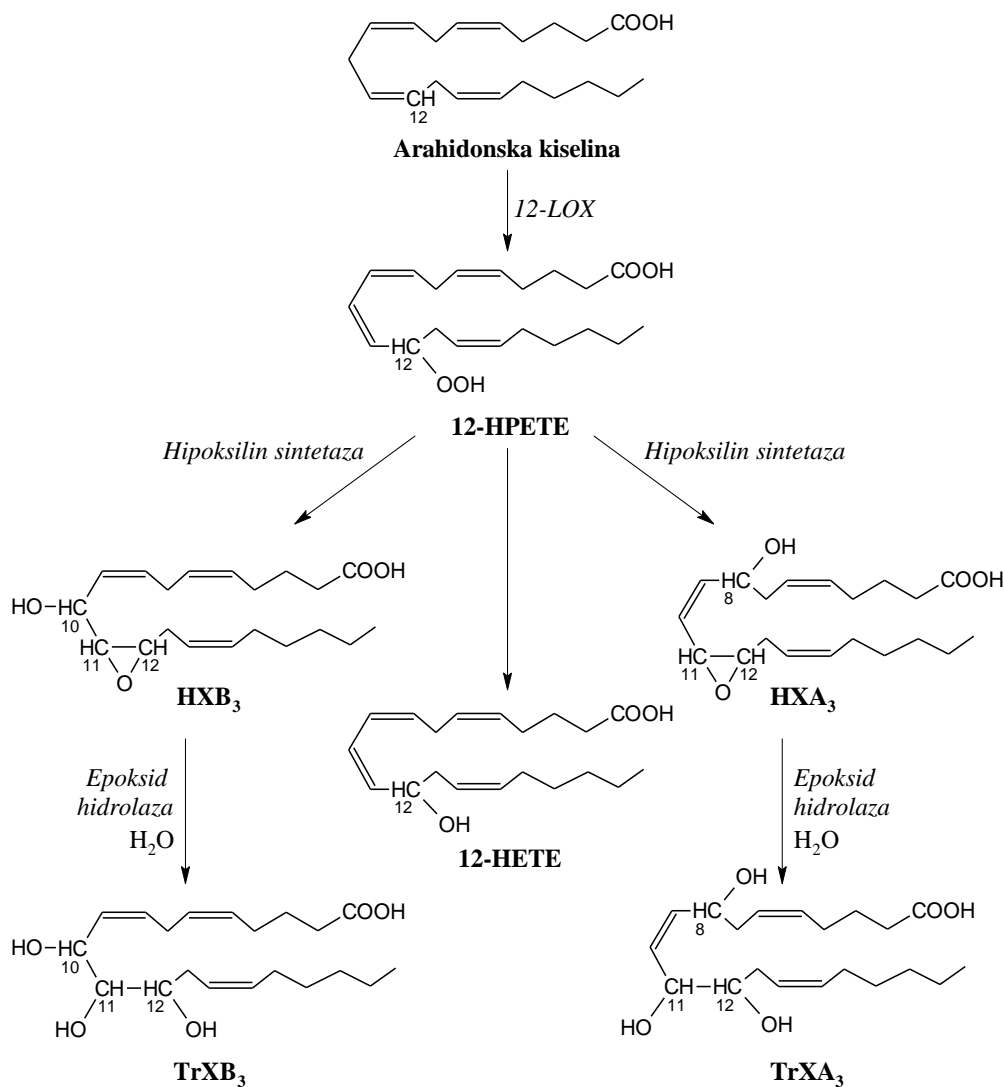
Slika 2.22. Mehanizam nastajanja LTC₄ uz pomoć enzima LTC₄-sintetaze

LTD₄ nastaje iz LTC₄ u reakciji katalizovanoj enzimom γ -glutamil transpeptidaza, gde je adicija molekula vode na LTC₄ praćena otpuštanjem γ -glutamata. LTE₄ nastaje otpuštanjem molekula glicina iz LTD₄ pod dejstvom cistenil-glicin-dipeptidaze (Slika 2.18.).

Leukotrieni se sintetisu u mnogim ćelijama, a najviše u leukocitima i imaju važnu ulogu u raznim imunološkim poremećajima i inflamatornim procesima, od kojih su naizraženije razne alergije i astma. Naime, LT deluju na ćelije preko LT receptora iz klase rodopsinskih receptora, a nalaze se na membranama raznih ćelija koje učestvuju u imunološkom odgovoru organizma. Shodno tome, LTB₄ utiče na hemotaksiju i agregaciju leukocita, permeabilnost krvnih sudova, proliferaciju T-ćelija, sekrecija interleukina 1 i 2; LTC₄ i LTD₄ izazivaju anafilaksiju, vazodilataciju, utiču na permeabilnost krvnih sudova, bronhokonstrikciju, a LTE₄ utiče na vazodilataciju, anafilaksiju i bronhokonstrikciju. Neke bolesti kod kojih je sinteza LT mnogostruko povećana su: bolesti disajnih organa (astma, alergijski rinitis, bronhitis, bronhopulmonarna displazija, cistična fibroza, adultni respiratorni distress sindrom (ARDS)), imunološki poremećaji (artritis, glomerularni nefritis, giht, psorijaza, reumatoidni artritis, pri transplataciji, razni sistemski imunološki poremećaji kao npr. lupus),

kardiovaskularna oboljenja (ateroskleroza, aneurizma aorte), tumori (leukemija, limfomi i tumori raznih organa), (Peters-Golden i Henderson, 2007).

Postoje tri tipa 12-lipooksigenaza (12-LOX): leukocitna, trombocitna i epidermalna. Tipovi 12-LOX razlikuju se kako po lokaciji tako i po stereochemiji reakcije koju katalizuju. Trombocitna i leukocitna 12-LOX vode ka nastanku 12(*S*)-proizvoda, dok epidermalna ka 12(*R*)-proizvodu. Pri metabolizmu arahidonske kiseline, koji katalizuje 12-LOX (*Slika 2.23.*), nastaju različiti bioaktivni molekuli: 12-hidroperoksieikosatetraen-kiselina (12-HPETE), 12-12-HETE, hipoksilin A₃ i B₃ (HXA₃, HXB₃) i triksilin A₃ i B₃ (TrXA₃, TrXB₃).



Slika 2.23. 12-Lipooksigenazni put metabolizma arahidonske kiseline (HETE - hidroksieikozatetraenoat, HPETE - hidroperoksieikozatetraenoat, HX - hipoksilin, TrX - trioksilin)

Mehanizam delovanja svih lipooksigenaza je veoma sličan, razlikuje se samo po broju ugljenikovog atoma na kom se odigrava reakcija. Slično nastajanju 5-HPETE proizvoda dejstvom 5-LOX (Slika 2.19.), prva reakcija 12-LOX, trombocitne i leukocitne je stereospecifična apstrakcija *pro-S* vodonikovog atoma sa C₁₀ položaja arahidonske kiseline, pri čemu dolazi, kao i kod svih lipooksigenaza, do redukcije Fe³⁺ u Fe²⁺. Sledeći korak je adicija O₂ molekula na C₁₂ položaj i dobijanje 12-HPETE. Trombocitna 12-LOX dalje katalizuje biosintezu 12(*S*)-hidroksi-(5*Z*,8*Z*,10*E*,14*Z*)-eikosatetraen-kiseline (12-HETE), dok leukocitni tip 12-LOX pored 12-HETE može da katalizuje i reakciju nastajanja 15-HETE.

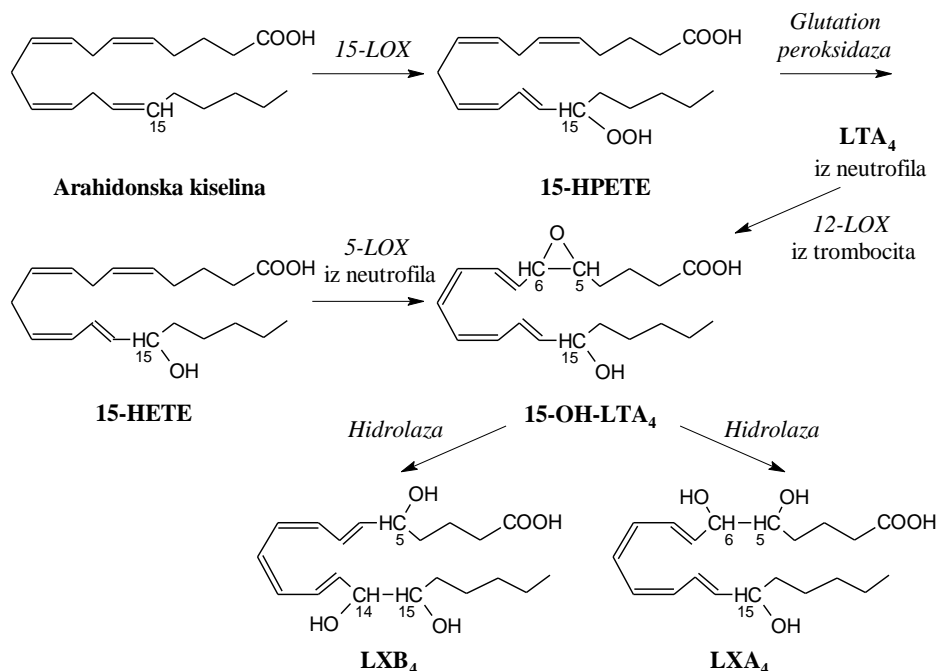
U pogledu fiziološkog dejstva, 12-HETE, kao i obe vrste 12-LOX, trombocitne i leukocitne, pronađeni su u tumorskim ćelijama različitih organa. Smatra se da ovaj enzim ima veliku ulogu u proliferaciji tumorskih ćelija, kao i u njihovom daljem rastu, jer je zabeležena mnogo veća koncentracija 12-LOX u malignim nego u benignim ćelijama tumora prostate, pankreasa, dojki i pluća (Nie i Horn, 2002). Zbog navedenih razloga, pronalaženje što potentnijih inhibitora 12-LOX danas je veoma aktuelno (Ding i sar., 2003).

Hipoksilin sintetaze vrše konverziju 12-HPETE proizvoda do HXA₃ i HXB₃, koji se zatim, pod uticajem epoksid hidrolaze prevode u krajnje proizvode TrXA₃ i TrXB₃ (Slika 2.23.; Marks i Fürstenberg, 1999).

Kao i kod ostalih eikozanoida, i sinteza hipoksilina (HX) i TrX povećava se u procesima inflamacije, ali se o njihovoj funkciji još uvek relativno malo zna. Postoje dve vrste hiposkilina, a to su HXA₃ i HXB₃, od kojih je samo HXA₃ biološki aktivan. Uloga HX vezuje se za povećanje koncentracije intracelularnog Ca²⁺, kao i za mobilizaciju istog kroz membranu. Poznato je da podstiče sekreciju insulina iz ćelija pankreasa, da inhibira nastanak cistične fibroze u plućima, kao i da utiče na sintezu nekih neurotransmitera. Trenutno su u toku intenzivna ispitivanja o ulozi HXA₃ u procesu apoptoze i nastanku tumora (Nigam i sar., 2007).

Trioksilini nastaju direktno iz odgovarajućeg HX. Postoje dve vrste TrX, a to su TrXA₃ i TrXB₃. Još uvek, prava uloga TrX se sa sigurnošću ne zna. Povećana sinteza TrX javlja se uglavnom gde i povećana sinteza HX. Jedna od teorija je ta da je uloga TrX važna u smanjenju koncentracije HX u organizmu. Njihova velika koncentracija zabeležena je u mnogim bolestima kože, kao što je na primer psorijaza (Antón i sar., 2002).

Prva reakcija metabolizma arahidonske kiseline katalizovana 15-lipooksigenazom je, kao i kod svih lipooksigenazom katalizovanih biosinteza, stereospecifična apstrakcija *pro-S* vodonika, ali sa položaja C₁₃ arahidonske kiseline (Slika 2.19.). Sledeća reakcija je adicija O₂ molekula na C₁₅ položaj, pri čemu nastaje 15-hidroperoksieikosatetraen kiselina (15-HPETE). Dalji metabolizam 15-HPETE može se kretati u više smerova, od kojih je najzanimljivije nastajanje LX transcelularnom biosintezom (Curtis-Prior, 2004). Na Slici 2.24. prikazane su faze nastajanja lipoksina LXA₄ i LXB₄.



Slika 2.24. Dva moguća puta nastanka lipoksina transcelularnom biosintezom

Prvi biosintetski put obuhvata nastanak 15-hidroeikosatetraen kiseline (15-HETE) uz pomoć 15-LOX u bilo kojoj ćeliji koja ima 15-LOX, npr. epitelna ćelija, i dalju transformaciju 15-HETE u neutrofilima do nastanka lipoksina. Drugi put sinteze lipoksina počinje u neutrofilima, gde LTA₄ napušta ćeliju neutrofila, ulazi u trombocite i uz pomoć 12-LOX i odgovarajućih hidrolaza transformiše u lipoksine (Folco i Murphy, 2006). Lipoksini mogu da nastanu i samo u neutrofilima, tako što će nosintetisana esterifikovana 15-HETE ući u sastav fosfolipida u ćelijskoj membrani i po potrebi, u toku inflamacije, biti oslobođena uz pomoć PLA₂ u citoplazmu, a enzimom 5-LOX transformisana do lipoksina (Kantarci i Van Dyke, 2003).

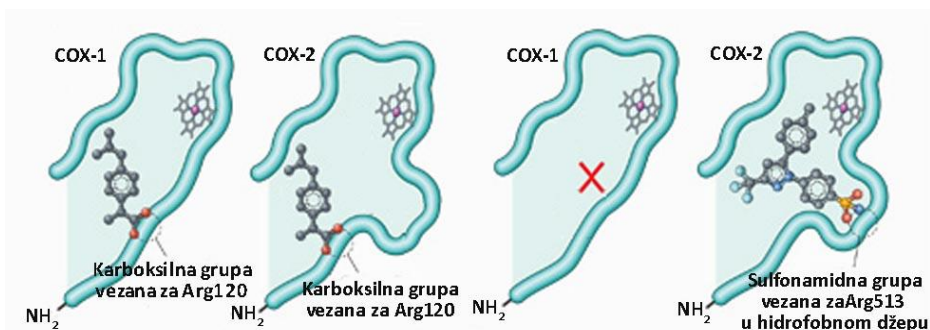
Najzastupljeniji lipoksini u naučnim ispitivanjima su LXA₄ i LXB₄. O ulozi ovih eikozanoida se još uvek ne zna dovoljno. Njihova sinteza povećana je u svim procesima gde i sinteza LT, a posebno u procesu inflamacije. Ono što je zanimljivo jeste to da oni imaju antiinflamatorno dejstvo, potpuno suprotno od, na primer, cistein leukotriena i smatra se da je njihova uloga značajna u kontroli stepena odgovora organizma pri inflamaciji (Gaddi i sar., 2004). Oni aktiviraju sintezu halona, glikopeptida koji inhibiraju proces mitoze. U procesima inflamacije LX kontrolišu kretanje neutrofila ka mestu inflamacije, a pri sintezi LX u

neutrofilima uz pomoć 5-LOX koncentracija LT se drastično smanjuje (Kantarci i Van Dyke, 2003).

2.3.5. Inhibitori enzima ciklooksigenaznog i lipooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline

Najznačajnije inhibitore enzima ciklooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline predstavljaju nesumnjivo inhibitori same ciklooksigenaze. Dve najveće grupe ovih inhibitora obuhvataju glikokortikoide, klasu steroidnih jedinjenja i nesteroidne antiinflamatorne lekove (NSAIL). Glikokortikosteroidi koriste se za supresiju različitih alergijskih, inflamatornih i autoimunih poremećaja i imaju izuzetno važnu terapijsku primenu u lečenju astme i pri transplantaciji organa kao imunosupresanti. Oni mogu da spreče različite leukocitne procese (epitelnu adheziju, migraciju, fagocitozu i sl.), kao i sintezu glavnih produkata inflamacije, prostaglandina i leukotriena. Međutim, većina glikokortikoida koji se primenjuju nisu selektivni, tako da dužom upotrebom mogu da izazovu niz neželjenih anaboličkih procesa. Sa druge strane, NSAIL mogu da ispoljavaju tri različita efekta: antiinflamatorni, analgetički i antipiretički. Poznato je da je antiinflamatorno dejstvo NSAIL uglavnom u vezi sa inhibicijom COX-2, dok su njihovi neželjeni efekti, a posebno oni koji se odnose na gastrointestinalni trakt, velikim delom posledica inhibicije COX-1. Većina tradicionalnih NSAIL koji se danas primenjuju, inhibiraju oba COX izoenzima, iako međusobno mogu da se razlikuju prema stepenu njihove inhibicije i selektivnosti, a mogu da se podele na klasične, neselektivne NSAIL (aspirin, ibuprofen, diklofenak) i selektivne NSAIL inhibitore COX-2 (celekoksib, refekoksib; Rang i sar., 2004).

Ove dve grupe inhibitora razlikuju se po mestu vezivanja u aktivnom centru enzima (*Slika 2.25.*).



Slika 2.25. Delovanje neselektivnih i selektivnih NSAID na COX-1 i COX-2
(www.netterimages.com/image/11131.htm, april 2011)

Naime, neselektivni inhibitori COX vezuju se na ulazu u aktivni centar, blokirajući pristup arahidonskoj kiselini. Selektivni inhibitori COX-2 vezuju se u hidrofobnom džepu na polovini aktivnog centra, što je, zbog prisustva izoleucina, nemoguće kod COX-1 izoforme.

Prema hemijskoj strukturi, NSAID mogu da se podele u nekoliko grupa i čine ih različite klase jedinjenja: derivati anilina (paracetamol), salicilne kiseline (aspirin), antranilne kiseline (mefenaminska kiselina), indolsirćetne kiseline (indometacin), fenilsirćetne kiseline (diklofenak), propionske kiseline (ibuprofen, ketoprofen), sulfona i sulfonamida (rofekoksib, celekoksib) i sl.

Pored sintetskih NSAID, postoji i niz prirodnih proizvoda, kao npr. kurkumin (Zhang i sar., 1999), omega-3-masne kiseline (Curtis i sar., 2000), rezveratrol (Jang i Pezzuto, 1998), flavonoidi (Mutoh i sar., 2000), neksrutin (www.nextpharmaceuticals.com), koji mogu selektivno da inhibiraju COX-2 aktivnost i na taj način učestvuju u supresiji inflamacije.

Pored TXA_2 , fiziološkog antagonista PGI_2 , značajnu grupu inhibitora prostaciklin sintaze predstavljaju NSAID, koji zapravo primarno deluju na COX-1/2 i sprečavaju sintezu PGH_2 , koji je direktni prekursor PGI_2 , ali mogu da utiču i na formiranje 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$, stabilnog degradacionog proizvoda PGI_2 . Naime, ispitivanja su pokazala da neki NSAID, poput rofekoksiba (Griffon i sar., 2007), mogu da utiču na produkciju 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$, čija koncentracija je značajno povećana kod pacijenata sa sepsom (Schildknecht i sar., 2004).

Inhibitori produkcije TXA_2 posebno su značajni agensi u lečenju bolesti kardiovaskularnog sistema i prevenciji metastaze tumora. Oni mogu da budu inhibitori TXA_2 sintaze ili antagonisti TXA_2 receptora, ali mogu i da ispoljavaju dualno dejstvo (Gresele i sar., 1991). Derivati imidazola pokazali su značajnu inhibiciju TXA sintaze (Iizuka i sar., 1981; Ishitsuka i sar., 2009; Kontogiorgis i Hadjipavlou-Litina, 2010), iako su ispitivanja

pokazala da dazoksiben, dazmagrel, pirmagrel, isbogrel, ali i ozagrel u kliničkim ispitivanjima ne daju nužno dobre rezultate (Kontogiorgis i Hadjipavlou-Litina, 2010). Kao antagonisti TXA₂ receptora, poznati su prostanoidni derivati (ifetroban, domitroban i variprost) i ne-prostanoidni derivati, jedinjenja koja najčešće sadrže fenilsulfonamidnu grupu (sulotroban, linotroban, ramatroban) ili su hinonski derivati (seratrodast). Dualni inhibitori ispoljavaju obe ove aktivnosti i pokazuju znatno bolju kliničku efikasnost od prethodno navedenih inhibitora. Savremena klinička ispitivanja potvrdila su značajan potencijal ridogrela, terbogrela i pikotamida (sadrže piridil grupu), BM-567, BM-573 i BM-531 (derivati *N*-alkilsulfoniluree), PBT-3 (lipid) i terutrobana (Kontogiorgis i Hadjipavlou-Litina, 2010).

U pogledu inhibicije nastajanja PGE₂, ispitivanja su pokazala da aspirin, indometacin i naproksen utiču na nivo PGE₂ (Jordan i Castracane, 1976), odnosno da inhibitori COX enzima mogu da spreče njegovu produkciju (Jachak, 2007).

Takođe, produkcija PGF_{2α} može biti smanjena dejstvom NSAIL, npr. ibuprofen potpuno sprečava njegovu sintezu, dok lipooksigenatni inhibitori, poput bajkaleina, mogu da smanje akumulaciju ovog proizvoda (Separovic i Dorman, 1993).

U opštem smislu, inhibitori enzima lipooksigenaznog puta podrazumevaju grupu inhibitora sinteze leukotriena, koji najveću primenu pronalaze u terapiji lečenja astme i alergija. U zavisnosti od toga na kom mestu inhibiraju metabolizam nastanka LT, njihova podela se može da se izvrši na: inhibitore enzima 5-LOX, FLAP (protein koji aktivira 5-lipooksigenazu; *Five Lipoxygenase Activating Protein*) inhibitore, inhibitore LT receptora i inhibitore PLA₂.

Postoje tri osnovne grupe inhibitora 5-LOX: redoks inhibitori, inhibitori sa helatirajućim efektom na jon Fe³⁺ u aktivnom centru enzima i kompetitivni reverzibilni ne-redoks inhibitori. Mehanizam delovanja redoks inhibitora zasniva se na redukciji Fe³⁺ jona u aktivnom centru 5-LOX. Inhibitori iz ove grupe su mali lipofilni molekuli sa jednim ili više aromatičnih prstenova, kao npr. triciklični benzotiazinon L-615, hidroksibenzofuran L-656, dihidrobenzofuranol L-670 (Young, 1999), ali i prirodni proizvodi iz grupe flavonoida i kumarina poput kafene kiseline ili cirsilola. Jedan od redoks inhibitora, koji se primenjuje lokalno u terapiji psorijaze i artritisa, je lonapalen (Charlier i Michaux, 2003). Mehanizam dejstva inhibitora enzima 5-LOX sa helatirajućim efektom zasniva se na njihovom vezivanju

za katalitički centar, tačnije za jon Fe^{3+} , pri čemu enzim ne može da katalizuje nastanak 5-HPETE i tako inhibira nastanak LT. Najpotentniji inhibitori ove vrste su molekuli iz grupe *N*-hidroksi uree, poput zileutona, fenleutona i atreleutona. Ova vrsta inhibitora našla je primenu u terapijske svrhe i lekovi protiv astme i alergija pripadaju upravo ovoj grupi (Werz i Steinhilber, 2005). Kompetitivni reverzibilni ne-redoks inhibitori (npr. ZD-2381 ili prirodni proizvod justicidin B) ne primenjuju se u terapijske svrhe, jer do sada ni jedan inhibitor nije ispoljio bolju aktivnost od, na primer, zileutona.

FLAP inhibitori vezuju se za FLAP i time onemogućavaju vezivanje arahidonske kiseline. Bez interakcije FLAP-a i arahidonske kiseline, dalje reakcije sinteze LT nisu moguće. Najpotentniji inhibitor iz ove grupe je MK-886, ali još uvek se ne koristi u terapijske svrhe (Young, 1999).

Inhibitori leukotrienskih receptora su našli veliku terapijsku primenu. Oni se vezuju za LT receptore onemogućujući delovanje leukotriena pa reakcija organizma koju izazivaju LT izostaje (Bernstein, 1998). Zato se ovi inhibitori intenzivno koriste u terapiji astme, a najpotentniji su: zafirlukast, montelukast i pranlukast.

Grupa inhibitora PLA_2 spada u grupu steroidnih antiinflamatornih inhibitora sinteze eikozanoida uopšte. Glikokortikoidi, koji se koriste kao antiinflamatorni agensi, a odnose se na metabolizam arahidonske kiseline, inhibiraju delovanje PLA_2 i samim tim sprečavaju oslobađanje arahidonske kiseline iz ćelijske membrane, zbog čega sinteza svih eikozanoida izostaje (Rang i sar., 2004).

Mehanizam delovanja glikokortikoida je isti kao i kod ostalih steroidnih hormona, a podrazumeva delovanje preko receptora koji se nalaze u jedru i uz pomoć kojih se ostvaruje regulacija na nivou transkripcije. Aktiviran receptor vezuje se za određeni domen DNK u jedru i aktivira transkripciju gena proteina lipokortina-1, koji zatim inhibira PLA_2 (Barnes, 1998). Glikokortikoidi, koji se najčešće primenjuju u antinflatornoj terapiji, su: deksametazon, beklometazon dipropionat, flutikazon i budesonid.

Iako su do sada najbolje proučeni inhibitori puta sinteze leukotriena, poslednjih godina, kako se povećavaju saznanja o biološkom dejstvu lipoksina, 12-HETE, hipoksilina i trioksilina, inhibitori 12-LOX i 15-LOX postaju sve zanimljiviji. Tako na primer, od kada je poznato da je 12-LOX važan faktor u rastu i razvoju tumora, sve više truda ulaže se u

pronalaženje njegovih inhibitora. Niz prirodnih proizvoda, kao na primer bajkalein, eskuletin, gospin, kvercetin i dr. pokazuju 12-LOX inhibitornu aktivnost (Schneider i Bucar, 2005).

Inhibicija 15-LOX enzima može biti ostvarena vezivanjem agenasa za Fe^{3+} u aktivnom centru ovog enzima. Jedan od najpotentnijih inhibitora 15-LOX je ebselen, ali ovo jedinjenje može da inhibira i ostale LOX (Walther i sar., 1999).

2.4. Antimikrobna aktivnost i etarska ulja

Antimikrobni efekat etarskih ulja poznat je vekovima unazad, a poslednjih par decenija intenzivno se proučava. Primarni razlog intenzivnih ispitivanja je sve češća pojava multiple rezistencije bakterija na konvencionalne antibiotike, tj. na dva ili više antibiotika iz hemijski različitih grupa ili stvaranje različitih mehanizma rezistencije bakterija, što dovodi do velikih problema u terapiji (Knezevic i Petrovic, 2008). Takođe, konvencionalni antimikrobni agensi sve češće ispoljavaju neželjene efekte kod pacijenata u vidu raznih alergija i drugih kontraindikacija. Pored primene u terapijske svrhe, u prehrambenoj industriji raste potreba za upotrebom prirodnih konzervanasa umesto sintetskih aditiva hrani i praćenjem trenda danas popularne organske hrane. Naime, etarska ulja, bogata terpenskim komponentama su dobri konzervansi zbog potentnog antimikrobnog delovanja ovih jedinjenja, tj. inhibicije razmnožavanja štetnih mikroorganizama u hrani (Reichling i sar., 2009; Mazari i sar., 2010).

Odavno je poznato da etarska ulja pokazuju značajan negativan uticaj na rast i razmnožavanje bakterija i njihova primena u tradicionalnoj medicini, pri tretiranju bakterijskih infekcija, je višestruka. Međutim, još uvek ne postoji potpuno i zadovoljavajuće objašnjenje za mehanizam antimikrobnog delovanja etarskih ulja. Antimikrobni potencijal ovih prirodnih proizvoda za sada se objašnjava činjenicom da su etarska ulja i njihove komponente hidrofobni i da kao takvi narušavaju strukturu lipida koji ulaze u sastav membrana bakterija, čineći ih na taj način poroznim i lako propustljivim za različite molekule. U slučaju eukariotskih ćelija, narušava se struktura kako plazmalne membrane, tako i membrane mitohondrija i drugih organela (Schelz i sar., 2006; Alviano i Alviano, 2009). Gram negativne bakterije pored plazmalne membrane poseduju i spoljašnju membranu u sastavu ćelijskog zida, izgrađenu od lipopolisaharida koja je nepropustljiva za hidrofilne molekule, dok Gram pozitivne bakterije nemaju spoljašnju membranu. Bolja

osetljivost Gram pozitivnih bakterija na dejstvo etarskih ulja objašnjava se činjenicom da je plazmalna membrana ovih bakterija lakše dostupna za etarska ulja, što za posledicu ima povećanje propustljivosti membrane za jone, ekskreciju intracelularnih komponenti u spoljašnju sredinu i oštećenje enzimskog sistema bakterija. Dakle, antimikrobni efekat etarskih ulja objašnjava se narušavanjem strukture plazmalne membrane (Delamare i sar., 2007). Ipak, ostaje nejasno kakav je efekat etarskih ulja na spoljašnju membranu Gram negativnih bakterija i u kolikoj meri njihova struktura može da bude narušena. Burt (2004) ukazuje na činjenicu da se, takođe, i spoljašnja membrana Gram negativnih bakterija narušava i da ćelijska membrana postaje dostupna za etarska ulja.

Efekat etarskih ulja vrsta roda *Juniperus* ispitivan je na različite Gram pozitivne i Gram negativne bakterije i pregled dostupnih podataka u literaturi dat je u *Tabeli 2.6*. Pri ispitivanju antimikrobnog potencijala etarskih ulja, pored disk difuzione metode, najčešće se koristi agar diluciona metoda, kao i diluciona metoda u epruvetama ili mikrotitar pločama (Lahlou, 2004; Sarker i sar., 2007).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Priprema biljnih ekstrakata i etarskih ulja

Biljni materijal sakupljen je na području Republike Srbije, Republike Crne Gore, Republike Hrvatske i Republike Makedonije u periodu 2008-2010. godine. U cilju biohemijskih ispitivanja taksona roda *Juniperus* L., biljni materijal je pregledan i kolektovan u Kolekciji primeraka jemstva (Voucher collection) Herbariuma BUNS. Determinaciju je izvršio dr Goran Anačkov, docent na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, Republika Srbija. U *Tabeli 3.1.* prikazani su osnovni podaci o brojevima vaučera, lokalitetu i datumu sakupljanja ispitivanih ženskih jedinki osam vrsta kleke.

Tabela 3.1. Podaci iz vaučera ispitivanih vrsta roda *Juniperus*

Broj vaučera	Vrsta	Lokalitet	Datum
2-1869	<i>Juniperus communis</i> L. 1753 var. <i>communis</i>	Mokra Gora, Klisura Belog Rzava, Republika Srbija UTM 34T CP 4 74	sipari (karbonati) jul, 2009.
2-1872	<i>Juniperus macrocarpa</i> Sibth. et Sm 1816	Ostrvo Hvar, Grad Hvar, Republika Hrvatska 43°11'08.19"N 16°35'50.26"E	supralitoral, stene iznad plaže avgust, 2009.
2-1875	<i>Juniperus excelsa</i> M. Bieb. 1800	Prespansko jezero, ostrvo Golem Grad, Republika Makedonija UTM 34T DL 4 92	stene novembar, 2009.
2-1852	<i>Juniperus sibirica</i> Burgsdorf. 1787 (= <i>Juniperus communis</i> L. 1753 var. <i>saxatilis</i> , Pall. 1789; <i>Juniperus nana</i> Willd. 1796)	Stara planina, Babin zub, Republika Srbija, UTM 34T FP 2 30	ogolele stene jul, 2008.
2-1788	<i>Juniperus foetidissima</i> Willd. 1806	Ohrid, Galičica, Vidikovac Republika Makedonija UTM 34T DL 4 95	krečnjački kamenjar jul, 2010.
2-1791	<i>Juniperus oxycedrus</i> L. 1753 var. <i>oxycedrus</i>	Ostrvo Hvar, Grad Hvar, Republika Hrvatska	makija avgust, 2010.

		43°11'08.19"N 16°35'50.26"E		
2-1789	<i>Juniperus sabina</i> L. 1753 var. <i>sabina</i>	Mavrovo Galičnik Republika Makedonija UTM 34T DM 4 70	krečnjački kamenjar	jul, 2010.
2-1790	<i>Juniperus phoenicea</i> L. 1753 var. <i>phoenicea</i>	Hvar, Grad Hvar, Republika Hrvatska 43°11'08.19"N 16°35'50.26"E	makija	avgust, 2010.

Priprema metanolnih ekstrakata iglica i zrelih ženskih šišarki svih navedenih vrsta urađena je po istoj proceduri: iglice su odvojene od šišarki, odmereno je 30 g osušenog dela biljke, usitnjeno, preliveno sa 300 mL 80% metanola i macerirano u toku 72 časa na sobnoj temperaturi. Nakon ceđenja preko Büchner-ovog levka i uparavanja na rotacionom vakuum uparivaču, suvi ostatak sirovog ekstrakta rastvoren je u toploj destilovanoj vodi (1 mL dH₂O po g suvog ostatka). U cilju uklanjanja nepolarnih komponenti, ovaj rastvor ispiran je petrol-etrom (frakcija 40-60 °C) do potpunog obezbojavanja petrol-etarskog sloja, a zatim uparen na rotacionom vacuum uparivaču do suva. U *Tabeli 3.2.* prikazani su odgovarajući prinosi prečišćenog, suvog ekstrakta.

Tabela 3.2. Prinosi metanolnih ekstrakata ispitivanih vrsta roda *Juniperus*

Vrsta	iglice/ šišarke	Prinos
<i>Juniperus communis</i>	iglice	18.05%
	šišarke	21.69%
<i>Juniperus macrocarpa</i>	iglice	14.78%
	šišarke	22.29%
<i>Juniperus excelsa</i>	iglice	9.61%
	šišarke	8.49%
<i>Juniperus sibirica</i>	iglice	9.38%
	šišarke	8.65%
<i>Juniperus foetidissima</i>	iglice	16.19%
	šišarke	16.38%
<i>Juniperus oxycedrus</i>	iglice	23.62%
	šišarke	15.24%
<i>Juniperus sabina</i>	iglice	6.90%
	šišarke	14.00%
<i>Juniperus phoenicea</i>	iglice	18.92%
	šišarke	37.10%

Suvi ostatak je zatim rastvoren u nekoliko sistema, koji su korišćeni u odgovarajućim testovima:

- u smeši 0.5% mravlje kiseline i metanola (odnos 7:3) napravljeni su rastvori koncentracije 0.2 mg/mL, koji su korišćeni za određivanje kvantitativnog sastava primenom LC-MS/MS tehnike (tačna hromatografija sa tandemskim masenim detektorom; *Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry*)
- u 80% metanolu napravljeni su osnovni rastvori koncentracije 20 mg/mL, koji su korišćeni za ispitivanje antioksidantnog potencijala
- u dimetil sulfoksidu (DMSO) napravljeni su osnovni rastvori koncentracije 300 mg/mL, koji su korišćeni za ispitivanje antiinflamatornog potencijala

Etarska ulja iglica i šišarki svake vrste roda *Juniperus* dobijena su hidrodestilacijom odmerene mase usitnjenog biljnog materijala, iglica ili šišarki, u aparaturi po Clevenger-u. Recipijent (heksan) uklonjen je pažljivim uparavanjem pod sniženim pritiskom. Do analize, etarska ulja čuvana su na -20 °C. Etarsko ulje šišarki vrste *J. sibirica* bilo je predmet samo hemijske karakterizacije, dok su biohemijski i biološki testovi izostali usled male količine etarskog ulja koje je dobijeno u procesu izolacije. U *Tabeli 3.3.* prikazani su odgovarajući prinosi etarskih ulja.

Tabela 3.3. Prinosi etarskih ulja ispitivanih vrsta roda *Juniperus*

Vrsta	iglice/ šišarke	Prinos
<i>Juniperus communis</i>	iglice	0.84%
	šišarke	1.04%
<i>Juniperus macrocarpa</i>	iglice	0.86%
	šišarke	0.47%
<i>Juniperus excelsa</i>	iglice	1.29%
	šišarke	0.89%
<i>Juniperus sibirica</i>	iglice	2.04%
	šišarke	0.69%
<i>Juniperus foetidissima</i>	iglice	0.68%
	šišarke	2.03%
<i>Juniperus oxycedrus</i>	iglice	1.47%
	šišarke	0.15%
<i>Juniperus sabina</i>	iglice	2.54%
	šišarke	2.21%
<i>Juniperus phoenicea</i>	iglice	1.07%
	šišarke	3.37%

3.2. LC-MS/MS skrining odabranih fenolnih jedinjenja

Odabrane fenolne komponente u ispitivanim ekstraktima kvantifikovane su primenom LC-MS-MS tehnike. Korišćen je *Agilent Technologies 1200 Series Rapid Resolution* tečni hromatograf, kuplovan sa G6410A QqQ MS-MS detektorom sa elektrosprej jonskim izvorom (ESI), kontrolisan od strane *MassHunter* ver. B.03.01. softvera (Agilent Technologies). Za hromatografsko razdvajanje korišćena je Zorbax Eclipse XDB-C18 RR 4.6 mm × 50 mm × 1.8 μm (Agilent Technologies) reversno-fazna kolna pri temperaturi od 45 °C. Binarna mobilna faza sastojala se od 0.05% mravlje kiseline (A) i metanola (B), a protok je iznosio 1 mL/min. Primenjen je gradijentni mod, koji je podrazumevao sledeći odnos faza: 0 min 30% B, 6 min 70% B, 9 min 100% B, 12 min 100% B, sa post-vremenom od 3 min. Injektovana zapremina svih uzoraka bila je 5 μL. ESI parametri bili su: gas za sušenje (N₂) temperature 350 °C, protok 9 L/min, pritisak gasa nebulajzera 40 psi, napon na kapilari 4 kV, negativan polaritet. Jedinjenja su praćena u dinamičkom MRM (*multiple reactions monitoring*) modu. Ostali optimizovani parametri dati su u *Tabeli 3.4*. Ispitivani standardi rastvoreni su u u smeši 0.5% mravlje kiseline i metanola (odnos 7:3) do finalne koncentracije 0.2 mg/mL. Napravljen je osnovni miks standarda, tako da koncentracija svake komponente bude 100 μg/mL. Određivanje sadržaja standardnih fenolnih komponenata u ispitivanim ekstraktima urađeno je na osnovu standardne kalibracione krive (funkcija logaritma površine pika u zavisnosti od logaritma koncentracije standarda, $\log(A) = f \log(C)$) komponenti snimljene iz serije razblaženja miksa standarda koncentracije od 0.0015 do 25.0 μg/mL.

Tabela 3.4. LC-MS/MS parametri za kvantifikaciju standardnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima vrsta roda *Juniperus*

Jedinjenje	Retenciono vreme (min)	Napon fragmentora (V)	Jon prekursor (m/z)	Jon proizvod (m/z)	Koliziona energija (V)
galna kiselina	0.58	90	169	125	10
katehin	0.74	150	289	245	10
protokatehinska kiselina	0.79	105	153	109	9
hlorogenska kiselina	0.80	100	353	191	10
epigalokatehin galat	0.81	165	457	169	16
epikatehin	0.95	150	289	245	10
2,5-dihidroksibenzoeva kiselina	1.03	100	153	109	9

<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	1.08	80	137	93	10
eskuletin	1.13	105	177	133	15
kafena kiselina	1.18	100	179	135	10
vanilinska kiselina	1.24	100	167	108	15
siringinska kiselina	1.31	90	197	182	7
<i>p</i> -kumarinska kiselina	1.69	90	163	119	9
umbeliferon	1.73	120	161	133	19
skopoletin	1.77	80	191	176	8
ferulna kiselina	1.90	90	193	134	11
viteksin	1.90	200	431	311	22
sinapinska kiselina	1.92	100	223	193	17
luteolin-7- <i>O</i> -glukozid	2.13	230	447	285	30
hiperozid	2.16	200	463	300	30
kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	2.25	210	463	300	30
rutin	2.33	135	609	300	42
apiin	2.60	250	563	269	36
<i>o</i> -kumarinska kiselina	2.62	100	163	119	5
miricetin	2.67	150	317	179	20
kvercitrin	2.75	190	447	300	27
kemferol-3- <i>O</i> -glukozid	2.80	190	447	284	30
apigenin-7- <i>O</i> -glukozid	2.81	135	431	268	41
sekoizolaricirezinol	2.90	130	361	165	26
3,4-dimetoksicimetna kiselina	2.99	110	207	103	7
bajkalin	3.40	140	445	269	22
daidzein	3.43	145	253	208	31
matairezinol	3.66	130	357	122	24
kvercetin	3.74	130	301	151	15
naringenin	3.87	130	271	151	16
cimetna kiselina	3.91	100	147	103	5
luteolin	4.03	135	285	133	25
genistein	4.12	145	269	133	32
kemferol	4.55	130	285	285	0
apigenin	4.71	130	269	117	25
izoramnetin	4.79	160	315	300	21
krizoeriol	4.82	125	299	284	20
bajkalein	5.15	165	269	269	0
amentoflavon	5.78	220	537	375	35

3.3. GC-MS analiza etarskih ulja

Sva izolovana etarska ulja, nakon razblaživanja heksanom, analizirana su na *Agilent Technologies 6890N* gasnom hromatografu sa 5975B masenim spektrometrom. Injektovano je po 1 μ L uzorka u *split/splitless* inlet temperature 250 °C, u split modu (split odnos 1:100). Kao gas nosač korišćen je helijum čistoće 99.999 %, u režimu konstantnog protoka od 1.0 mL/min. Komponente su razdvojene na HP-5ms (*Agilent Technologies*) kapilarnoj koloni

dimenzija $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$, uz temperaturni program: startna temperatura $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $8\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, $15\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do $230\text{ }^{\circ}\text{C}$, $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do $270\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ukupno trajanje analize 16.9 min). Razdvojene komponente analizirane su na masenom spektrometru (temperatura transfer-linije $280\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura jonskog izvora $230\text{ }^{\circ}\text{C}$, energija elektrona 70 eV , temperatura kvadrupola $150\text{ }^{\circ}\text{C}$) u sken modu, u m/z opsegu 35–400. U cilju bolje korelacije masenih spektara sa spektralnim bibliotekama, instrument je tjuniran korišćenjem *Standard spectra tune-a*.

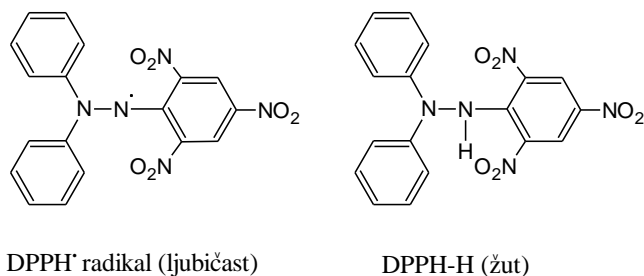
3.3.1. Obrada podataka

Podaci su obrađeni pomoću *Agilent Technologies MSD ChemStation* softvera (revizija E01.01.335) u kombinaciji sa *AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System, ver. 2.64)* i *NIST MS Search softverom (ver. 2.0d)*. *AMDIS* je korišćen za dekonvoluciju masenih spektara, tj. ekstrakciju čistih masenih spektara iz preklapljenih pikova, dok je *NIST MS Search* obezbedio algoritam za pretragu biblioteka komplementaran *PBM (Probability Best Match)* algoritmu *ChemStation-a*. Za identifikaciju masenih spektara korišćene su spektralne biblioteke *Wiley Registry of Mass Spectral Data 7th Edition* (338000 spektara, 289000 jedinjenja) i *NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library 05* (190825 spektara, 163198 jedinjenja). Identitet jedinjenja potvrđen je poređenjem Kovats-evih retencionih indeksa (KI) sa podacima iz literature (Adams, 2001). Kao standard za određivanje KI korišćeno je dizel ulje, za koga je analizom utvrđeno da sadrži smešu svih n-alkana u opsegu C8–C28 (odgovara Kovats indeksu 800-2800). Relativni udeli jedinjenja određeni su metodom normalizacije, na osnovu površine pikova u *TIC (total ion chromatogram)*.

3.4. Određivanje antioksidantnog potencijala

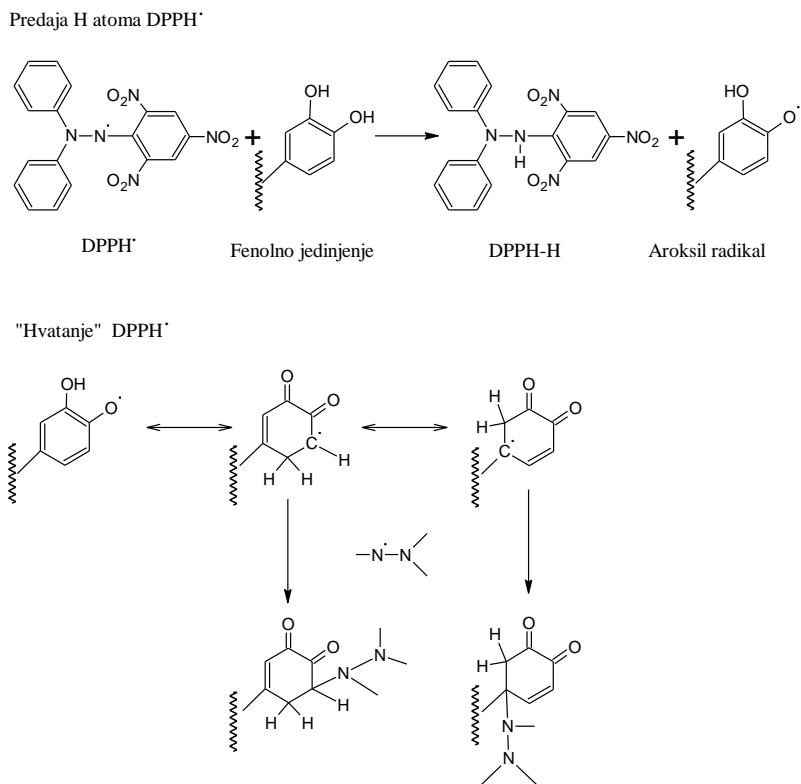
3.4.1. Određivanje neutralizacije DPPH[•] radikala

Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH[•] (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikala urađeno je primenom spektrofotometrijske metode (Espin i sar., 2000), prilagođene za mikro ploče, koja je zasnovana na praćenju promene boje ljubičasto obojenog rastvora stabilnog azot-centriranog DPPH[•] radikala u redukovanu, žuto obojenu formu, DPPH-H. Pojava žute boje objašnjava se sposobnošću pojedinih komponenata da deluju kao donori vodonika ili elektrona, pri čemu DPPH[•] prelazi u redukovani neutralni DPPH-H oblik (Slika 3.1.).



Slika 3.1. Radikalska i redukovana forma DPPH[•]

Neutralizacija DPPH[•] fenolnim jedinjenjima odvija se pomoću dva simultana mehanizma. Najpre, fenolno jedinjenje deluje kao donor H-atoma pri čemu nastaje redukovani, neutralni DPPH-H oblik i ariloksi radikal koji je rezonantno stabilizovan, a zatim, nastali ariloksil radikal može da reaguje sa još jednim DPPH[•] radikalom pri čemu dolazi do njihove kondenzacije i prelaska u neutralan molekul (Slika 3.2.).

Slika 3.2. Mehanizam „hvatanja“ DPPH[•] pomoću fenolnih jedinjenja**Reagensi:**

- 3 mmol/L DPPH[•] u etanolu - osnovni rastvor DPPH[•] reagensa: 0.0118 g DPPH[•] rastvoreno (ultrazvučno kupatilo) u 10 mL etanola (rastvor je čuvan u tamnoj boci na 4 °C, stabilan 14 dana)
- 90 μmol/L DPPH[•] u metanolu - radni rastvor DPPH[•] reagensa: 562.5 μL osnovnog rastvora dopunjeno do 25 mL metanolom (rastvor je pripremljen na dan merenja)
- Početne koncentracije ispitivanih uzoraka
 - ekstrakata: *J. excelsa*/iglice, *J. foetidissima*/iglice i šišarke i *J. oxycedrus*/iglice 0.0049, 0.0098, 0.0196, 0.039, 0.078. 0.156 i 0.312 mg/mL; *J. sabina*/šišarke 0.0196, 0.039, 0.078. 0.156 i 0.312, 0.625 i 1.25 mg/mL; *J. communis*/iglice i šišarke, *J. macrocarpa*/iglice, *J. excelsa*/šišarke, *J. sibirica*/iglice i šišarke, *J. sabina*/iglice i *J. phoenicea*/iglice 0.078, 0.156, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5 i 5.0 mg/mL; *J. macrocarpa*/šišarke, *J. oxycedrus*/šišarke i *J. phoenicea*/šišarke 1.25, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 i 80.0 mg/mL

- etarskih ulja: svih ispitivanih 15.63, 31.25, 62.5, 125.0, 250.0, 500.0 i 1000.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$.
- standarda: BHA (butilovani hidroksianizol) i BHT (butilovani hidroksitoluen) 0.078, 0.156, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5 i 5.0 mg/mL

Postupak:

Od ekstrakta početne koncentracije 0.2 g/mL napravljena je serija od sedam rastvora dvostrukih razblaženja, tako da je dobijen raspon početnih koncentracija ekstrakta 0.0049-80.0 mg/mL, u zavisnosti od vrste ekstrakta. Od etarskih ulja napravljene su serije od sedam dvosrukih razblaženja u rasponu početnih koncentracija etarskog ulja 15.63-1000.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Početne koncentracije, korišćene za standardne antioksidante BHA i BHT, iznosile su 0.078-5.0 mg/mL. Sve radne probe i kontrole obavljene su u tri ponavljanja.

Pripremljeni rastvori prikazani su u *Tabeli 3.5.*, a njihova apsorbancija je merena spektrofotometrijski (515 nm) nakon 60 min., uz razvijanje boje u mraku.

Tabela 3.5. Rastvori pripremljeni za određivanje neutralizacije DPPH^{*} radikala pri ispitivanju ekstrakata i standarda

Radna proba	Korekcija	Kontrola	Slepa proba
100 μL 90 $\mu\text{mol}/\text{L}$ DPPH [*]	100 μL MeOH	100 μL 90 $\mu\text{mol}/\text{L}$ DPPH [*]	100 μL MeOH
10 μL ekstrakt/etarsko ulje [*] /standarda	10 μL ekstrakt/etarsko ulje [*] /standarda	10 μL rastvarač (80% MeOH)	10 μL rastvarač (80% MeOH)
190 μL MeOH	190 μL MeOH	190 μL MeOH	190 μL MeOH

^{*}pri ispitivanju etarskog ulja, prvo je pripremljena odgovarajuća smeša početnih koncentracija etarskog ulja i MeOH, potom je ista nanosena na mikro ploču (200 μL), nakon čega je dodato po 100 μL 90 $\mu\text{mol}/\text{L}$ DPPH reagensa ili MeOH. Izmene u standardnoj proceduri uvedene su zbog slabe rastvorljivosti etarskog ulja.

Iz razlike apsorbancije radne probe (A_{rp}) i korekcije (A_{kor}) izračunate su apsorbancije (A) za svaku koncentraciju ispitivanog ekstrakta ili etarskog ulja, kao i za kontrolu:

$$A = A_{rp} - A_{kor}$$

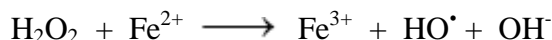
Kapacitet „hvatanja“ slobodnih (DPPH^{*}) radikala (RSC, *radical scavenging capacity*) ekstrakata i etarskih ulja različitih koncentracija (RSC_{DPPH}) računat je na osnovu sledeće jednačine, gde je A_{kon} apsorbancija kontrolne, a A_{sp} apsorbancija slepe probe:

$$RSC_{DPPH^{\bullet}} (\%) = (1 - A/(A_{kon} - A_{sp})) \times 100\%$$

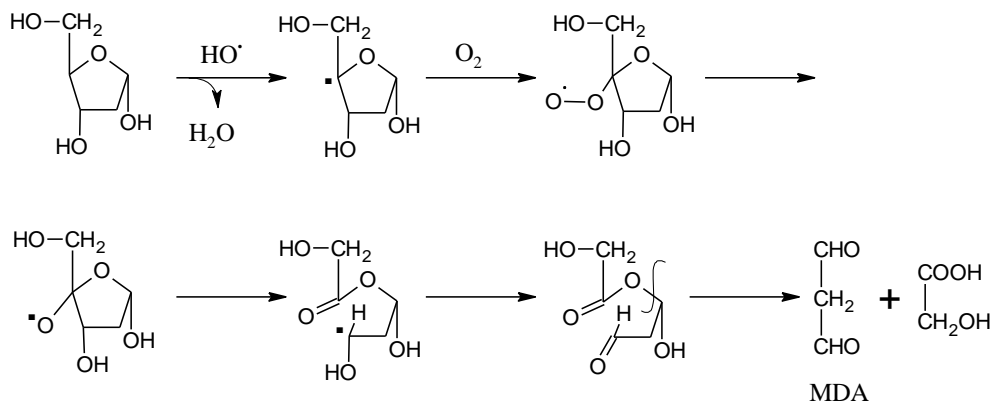
Na osnovu $RSC_{DPPH^{\bullet}}$ vrednosti, određene su IC_{50} vrednosti (koncentracija pri kojoj je neutralisano 50% radikala) očitavanjem sa odgovarajućeg grafika (funkcija $RSC_{DPPH^{\bullet}} (\%)$ u zavisnosti od radne koncentracije), a rezultat je izražen kao srednja vrednost tri određene IC_{50} vrednosti \pm standardna devijacija ($\mu\text{g/mL}$, $\mu\text{L/mL}$).

3.4.2. Određivanje kapaciteta „hvatanja“ HO^{\bullet} radikala

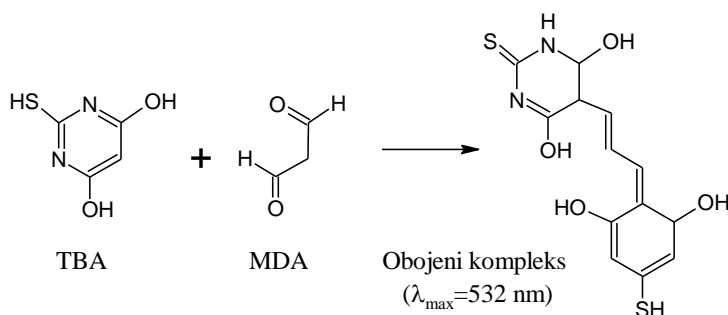
U cilju određivanja kapaciteta „hvatanja“ HO^{\bullet} radikala, primenjena je modifikovana metoda Gutteridge-a (1987). Fentonovim reakcionim sistemom generisani su hidroksil radikali:



Nastali reaktivni HO^{\bullet} u prisustvu 2-deoksiriboze i kiseonika grade malonildialdehid (Slika 3.3.), koji se zatim određuje TBA (tiobarbiturna kiselina) testom. TBA test zasnovan je na spektrofotometrijskom određivanju ružičasto obojenog kompleksa koji nastaje nakon reakcije malonildialdehida sa dva molekula TBA (Slika 3.4.).



Slika 3.3. Reakcija nastajanja malonildialdehida



Slika 3.4. Reakcija TBA i MDA

Reagensi:

1. 0.0147% H₂O₂: pripremljen je dopunjavanjem 42 μL 35% H₂O₂ do 100.0 mL dH₂O
2. 10.0 mmol/L FeSO₄: 0.1390 g FeSO₄ × 7 H₂O rastvoreno u 50.0 mL dH₂O
3. 0.05 mol/L 2-deoksiriboza: 0.1677 g 2-deoksiriboze rastvoreno u 25.0 mL fosfatnog pufera pH 7.4
4. 0.067 mol/L fosfatni pufer pH 7.4: 1.7506 g KH₂PO₄ i 7.6851 g Na₂HPO₄ rastvoreno u 1000.0 mL dH₂O
5. 0.0372 g/mL EDTA (etilendiamintetrasirćetna kiselina): 1.86 g EDTA rastvoreno u 50.0 mL dH₂O
6. TBA reagens: 3.0 g TBA , 120.0 g TCA i 10.4 mL HClO₄ rastvoreno u 800.0 mL dH₂O
7. Početne koncentracije ispitivanih uzoraka
 - ekstrakata: svih ispitivanih 12.5, 25.0, 50.0, 100.0, 150.0 i 200.0 mg/mL
 - standarda: BHA i BHT: 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0, 150.0 mg/mL

Postupak:

Od ekstrakta početne koncentracije 0.2 g/mL napravljena je serija od šest rastvora razblaženja, tako da je dobijen raspon početnih koncentracija ekstrakta 12.5-200 mg/mL. Standardni antioksidanti BHA i BHT korišćeni su u rasponu od sedam koncentracija koncentracije 1.56-150.0 mg/mL. Sve radne probe i kontrole obavljene su u tri ponavljanja.

Pripremljeni su odgovarajući rastvori (Tabela 3.6.) i inkubirani 60 min na 37 °C. Nakon dodatka 3.72% EDTA i TBA reagensa, smeša je zagrevana 10 min na 100 °C, a zatim

ohladena do sobne temperature. Svaka proba (0.2 mL) preneti je u mikro ploču, a apsorbancija rastvora merena je spektrofotometrijski na 532 nm.

Tabela 3.6. Rastvori pripremljeni za određivanje kapaciteta „hvatanja“ HO[•] radikala

Radna proba	Korekcija	Kontrola	Korekcija kontrole
100 μL 0.05 mmol/L 2-deoksiriboza	3.0 mL pufer pH 7.4	100 μL 0.05 mmol/L 2-deoksiriboza	3.0 mL pufer pH 7.4
20-40 μL ekstrakt/standard	20-40 μL ekstrakt/standard	20-40 μL 80% MeOH	20-40 μL 80% MeOH
100 μL 0.0147% H ₂ O ₂		100 μL 0.0147% H ₂ O ₂	
100 μL 10.0 mmol/L FeSO ₄		100 μL 10.0 mmol/L FeSO ₄	
2.7 mL pufer pH 7.4		2.7 mL pufer pH 7.4	
<i>Inkubacija 60 min na 37 °C</i>			
200 μL 3.72% EDTA	200 μL 3.72% EDTA	200 μL 3.72% EDTA	200 μL 3.72% EDTA
2.0 mL TBA reagens	2.0 mL TBA reagens	2.0 mL TBA reagens	2.0 mL TBA reagens
<i>Zagrevanje 10 min na 100 °C</i>			

Iz razlike apsorbancije radne probe (A_{rp}) i korekcije (A_{kor}) izračunate su apsorbancije (A) za svaku koncentraciju ispitivanog ekstrakta, kao i za kontrolu:

$$A = A_{rp} - A_{kor}$$

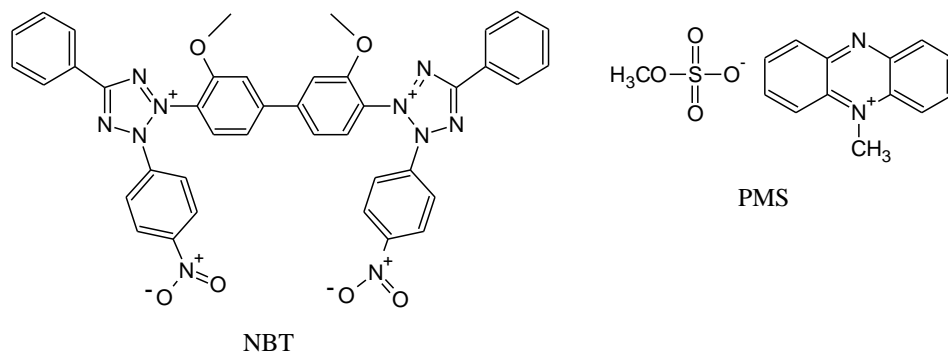
Kapacitet „hvatanja“ HO[•] radikala ($RSC_{HO^{\bullet}}$) ispitanih ekstrakata različitih koncentracija računat je na osnovu sledeće jednačine, gde je A_{kon} apsorbancija kontrolne probe (razlika između apsorbancije kontrole i korekcije kontrole):

$$RSC_{HO^{\bullet}} (\%) = (1 - A/A_{kon}) \times 100\%$$

Na osnovu $RSC_{HO^{\bullet}}$ vrednosti, određene su IC_{50} vrednosti (koncentracija pri kojoj je neutralisano 50% radikala) očitavanjem sa odgovarajućeg grafika (funkcija $RSC_{HO^{\bullet}} (\%)$ u zavisnosti od radne koncentracije), a rezultat je izražen kao srednja vrednost tri određene IC_{50} vrednosti \pm standardna devijacija ($\mu\text{g/mL}$).

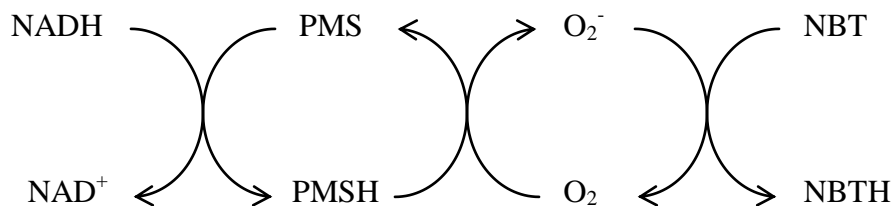
3.4.3. Određivanje kapaciteta „hvatanja“ $O_2^{\cdot-}$ radikala

Kapacitet „hvatanja“ superoksid anjon radikala ispitivanih ekstrakata određen je merenjem njihove sposobnosti da neutrališu $O_2^{\cdot-}$ nastale tokom aerobne redukcije tetrazolijum nitro-plavog (NBT, *Slika 3.5.*) pomoću NADH u prisustvu fenazin-metilsulfata (PMS, *Slika 3.5.*; Nishikimi, 1972).



Slika 3.5. Strukturne formule tetrazolijum nitro-plavog i fenazinmetilsulfata

Stepen redukcije NBT sa NADH u aerobnim uslovima je zanemarljiv (5%) i linearno raste sa količinom dodatog PMS. PMS se ponaša kao prenosilac elektrona i znatno utiče na mehanizam redukcije. S obzirom na to da je strukturno sličan flavinu, PMS u reakciji sa NADH prelazi u redukovani oblik, PMSH. Tokom njegove reoksidacije kiseonikom iz vazduha, dolazi do generisanja superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$) koji u velikoj meri (95%) redukuje NBT u formazan (Nishikimi, 1972; *Slika 3.6.*).



Slika 3.6. Mehanizam aerobne redukcije NBT

NBT je u oksidovanom obliku bezbojan, a redukcijom prelazi u NBTH koji je plave boje. Dodavanjem ekstrakta koji sadrži fenolna jedinjenja, dolazi do neutralizacije $O_2^{\cdot-}$ radikala i

smanjenja redukcije NBT reagensa. Količina neutralisanih radikala prati se spektrofotometrijski i proporcionalna je smanjenju intenziteta obojenja.

Reagensi:

1. 144 $\mu\text{mol/L}$ nitroblu-tetrazolijum: 0.0031 g NBT rastvoreno u 25.0 mL dH_2O
2. 600 $\mu\text{mol/L}$ fenazinmetilsulfat - osnovni rastvor PMS reagensa: 0.0046 g PMS rastvoreno u 25 mL dH_2O (rastvor čuvan u tamnoj boci)
3. 60 $\mu\text{mol/L}$ fenazinmetilsulfat - radni rastvor PMS reagensa: 0.25 mL osnovnog rastvora PMS dodato u 2.25 mL dH_2O (rastvor pripremljen neposredno pre merenja)
4. 677 $\mu\text{mol/L}$ NADH: 0.0048 g NADH rastvoreno u 10.0 mL dH_2O
5. 0.017 mol/L fosfatni pufer pH 8.3: 0.9321 g Na_2HPO_4 i 0.0182 g KH_2PO_4 rastvoreno u 100.0 mL dH_2O
6. Početne koncentracije ispitivanih supstanci
 - ekstrakata: *J. communis*/iglice i šišarke, *J. macrocarpa*/iglice, *J. excelsa*/iglice i šišarke, *J. sibirica*/iglice i šišarke, *J. foetidissima*/iglice i šišarke, *J. oxycedrus*/iglice i šišarke, *J. sabina*/iglice i šišarke i *J. phoenicea*/iglice 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 mg/mL; *J. macrocarpa*/šišarke i *J. phoenicea*/ šišarke 20.0, 40.0, 80.0, 100.0, 140.0, 160.0, 200.0 mg/mL

Postupak:

Od ekstrakata početne koncentracije 0.2 g/mL napravljene su serije od sedam rastvora razblaženja, tako da je dobijen raspon početnih koncentracija ekstrakta od 0.625 do 200 mg/mL. Sve radne probe i kontrole rađene su u tri ponavljanja.

Pripremljeni su odgovarajući rastvori (Tabela 3.7.), a njihova apsorbancija merena je (560 nm) nakon 5 min.

Tabela 3.7. Rastvori pripremljeni za određivanje kapaciteta „hvatanja“ $O_2^{\cdot-}$ radikala

Radna proba	Korekcija	Kontrola
200 μ L 144 μ mol/L NBT	1.5 mL pufer pH 8.3	200 μ L 144 μ mol/L NBT
10 μ L ekstrakt	10 μ L ekstrakt	10 μ L 80% MeOH
100 μ L 677 μ mol/L NADH*		100 μ L 677 μ mol/L NADH*
100 μ L 60 μ mol/L PMS*		100 μ L 60 μ mol/L PMS*
1.1 mL pufer pH 8.3		1.1 mL pH pufer 8.3

* rastvori su dodati neposredno jedan za drugim

Iz razlike apsorbancije radne probe (A_{rp}) i korekcije (A_{kor}) izračunate su apsorbancije (A) za svaku koncentraciju ispitivanog ekstrakta:

$$A = A_{rp} - A_{kor}$$

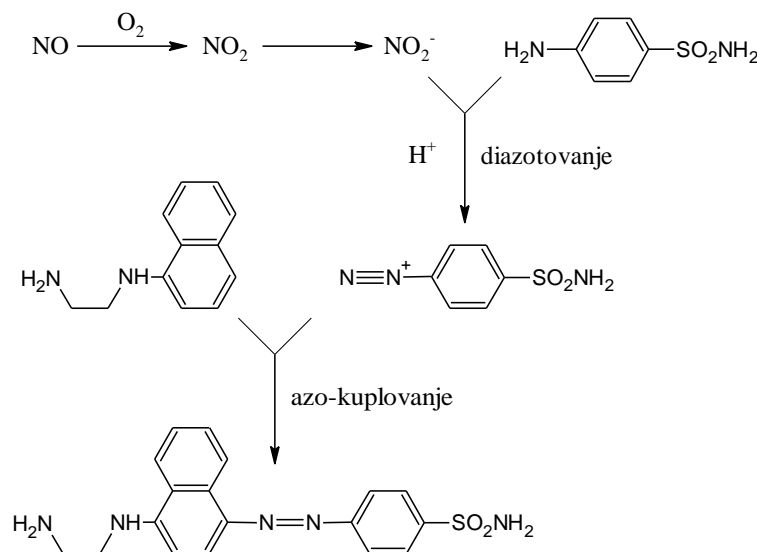
Kapacitet „hvatanja“ $O_2^{\cdot-}$ radikala ($RSC_{O_2^{\cdot-}}$) ispitanih ekstrakata različitih koncentracija računat je na osnovu sledeće jednačine, gde je A_{kon} apsorbancija kontrolne probe:

$$RSC_{O_2^{\cdot-}} (\%) = (1 - A/A_{kon}) \times 100\%$$

Na osnovu $RSC_{O_2^{\cdot-}}$ vrednosti, određene su IC_{50} vrednosti (koncentracija pri kojoj je neutralisano 50% radikala) očitavanjem sa odgovarajućeg grafika (funkcija $RSC_{O_2^{\cdot-}} (\%)$ u zavisnosti od radne koncentracije), a rezultat je izražen kao srednja vrednost tri određene IC_{50} vrednosti \pm standardna devijacija (μ g/mL).

3.4.4. Određivanje kapaciteta „hvatanja“ NO^{\cdot} radikala

Određivanje kapaciteta „hvatanja“ NO^{\cdot} radikala metanolnih ekstrakata vrsta roda *Juniperus* zasniva se na spektrofotometrijskom merenju neutralizacije generisanih nitritnih jona. U ovu svrhu korišćen je vodeni rastvor natrijum-nitroprusida (SNP) koji predstavlja izvor NO^{\cdot} radikala pri fiziološkom pH. Nastali NO^{\cdot} reaguje sa kiseonikom dajući nitritne jone, čija koncentracija se određuje po metodi Green-a i saradnika (1982), a koja se zasniva na spektrofotometrijskom određivanju purpurno-ružičastog diazo kompleksa, koji nastaje nakon reakcije NO_2^- i Griees-ovog reagensa na sobnoj temperaturi (Slika 3.7.).



Slika 3.7. Nastajanje diazo kompleksa

Reagensi:

- 10 mmol/L natrijum-nitroprusid dihidrata (SNP): 0.2980 g SNP rastvoreno u 100.0 mL fosfatnog pufera pH 7.4
- Griess-ov reagens: dobija se mešanjem jednakih zapremina rastvora **A** i **B**:
 - A**: 0.2% rastvor N-(1-naftil)-etilendiamin dihidrohlorida (NEDA): 0.5 g NEDA rastvoreno u 249.5 mL dH₂O
 - B**: 2% rastvor sulfanilamida (SA) u 4% fosfatnoj kiselini: 5 g SA rastvoreno u smeši 235.2 mL dH₂O i 5.80 mL H₃PO₄

Napomena: Smeša je stabilna 12 h na 4 °C, dok su pojedinačni rastvori stabilni 4 meseca.
- 0.067 mol/L fosfatni pufer pH 7.4: 1.7506 g KH₂PO₄ i 7.6851 g Na₂HPO₄ (19.3927 g Na₂HPO₄ 12H₂O) rastvoreno u 1000.0 mL dH₂O
- Početne koncentracije ispitivanih supstanci
 - ekstrakata: *J. communis*/igice i šišarke, *J. macrocarpa*/igice i šišarke, *J. excelsa*/igice i šišarke, *J. sibirica*/igice i šišarke, *J. foetidissima*/iglice i šišarke, *J. oxycedrus*/iglice i šišarke, *J. sabina*/šišarke i *J. phoenicea*/iglice i šišarke 2.5, 15.0, 25.0, 50.0, 100.0, 150.0 i 200.0 mg/mL; *J. sabina*/iglice 0.25, 1.0, 2.5, 15.0, 25.0, 50.0 i 100.0 mg/mL

Postupak:

Od ekstrakata početne koncentracije 0.2 g/mL napravljene su serije od sedam rastvora razblaženja, tako da je dobijen raspon početnih koncentracija ekstrakta 0.25-200.0 mg/mL. Sve radne probe i kontrole rađene su u tri ponavljanja.

Pripremljeni su odgovarajući rastvori (Tabela 3.8.), a njihova apsorbanacija merena je (546 nm) nakon 90 min.

Tabela 3.8. Rastvori pripremljeni za određivanje kapaciteta „hvatanja“ NO[•] radikala

Radna proba	Korekcija	Kontrola	Korekcija kontrole
0.5 mL 10 mmol/L SNP	1.0 mL pufer pH 7.4	0.5 mL 10 mmol/L SNP	1.0 mL pufer pH 7.4
30-20 µL ekstrakt	30-20 µL ekstrakt	30-20 µL 80% MeOH	30-20 µL 80% MeOH
0.5 mL pufer pH 7.4		0.5 mL pufer pH 7.4	
<i>Inkubacija 90 min na 25 °C (konstantno svetlo)</i>			
1 mL Griess-ov reagens			

Napomena: svi reagensi dodati su u mraku

Iz razlike apsorbanacije radne probe (A_{rp}) i korekcije (A_{kor}) izračunate su apsorbanacije (A) za svaku koncentraciju ispitivanog ekstrakta kao i za kontrolu:

$$A = A_{rp} - A_{kor}$$

Kapacitet „hvatanja“ azot(II)-oksida ($RSC_{NO^{\bullet}}$) ispitanih ekstrakata različitih koncentracija računat je na osnovu sledeće jednačine, gde je A_{kon} apsorbanacija kontrolne probe (razlika između apsorbanacije kontrole i korekcije kontrole):

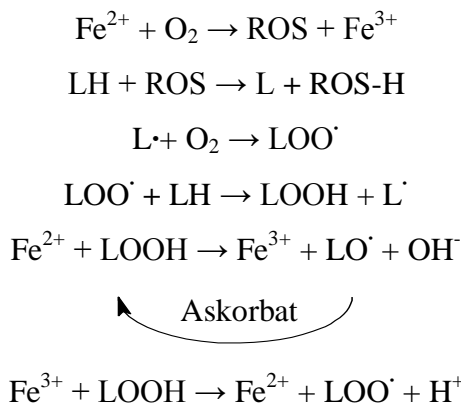
$$RSC_{NO^{\bullet}} (\%) = (1 - A/A_{kon}) \times 100\%$$

Na osnovu $RSC_{NO^{\bullet}}$ vrednosti, određene su IC_{50} vrednosti (koncentracija pri kojoj je neutralisano 50% radikala) očitavanjem sa odgovarajućeg grafika (funkcija $RSC_{NO^{\bullet}} (\%)$ u zavisnosti od radne koncentracije), a rezultat je izražen kao srednja vrednost tri određene IC_{50} vrednosti \pm standardna devijacija (mg/mL).

3.4.5. Određivanje inhibicije lipidne peroksidacije

Određivanje sposobnosti ispitivanih ekstrakata/etarskih ulja da inhibiraju lipidnu peroksidaciju urađeno je TBA metodom (Halliwell i Gutteridge, 1986), pri čemu su polinezasićene masne kiseline iz lanenog ulja, dobijene ekstrakcijom po Soxlet-u, korišćene kao supstrat za lipidnu peroksidaciju izazvanu Fe^{2+} jonima u sinergizmu sa askorbatom.

Tačan mehanizam inicijacije lipidne peroksidacije Fe^{2+} jonima nije u potpunosti razjašnjen. Poznato je da Fe^{2+} joni mogu reagovati sa kiseonikom iz vazduha i pri tom generisati ROS, kao npr. superoksid anjon ($\text{O}_2^{\cdot-}$), za koji se pretpostavlja da je inicijator lančane radicalske reakcije lipidne peroksidacije.



Inicijalna reakcija kiseoničnog radikala sa polinezasićenom masnom kiselinom (LH) vodi nastajanju lipidnog radikala (L^{\cdot}), koji zatim reaguje sa kiseonikom i gradi peroksil radikal (LOO^{\cdot}). Nastali LOO^{\cdot} može da reaguje sa sledećim molekulom LH dajući novi lipidni radikal i lipidni hidroperoksid (LOOH). U reakciji sa redukovanim metalima, kao što su npr. Fe^{2+} ili Cu^{2+} , LOOH daje lipidni alkoksi radikal (LO^{\cdot}), koji, kao i LOO^{\cdot} , vrši dalju propagaciju lančane peroksidacije. Nastali oksidovani metali (Fe^{3+} ili Cu^{3+}) redukuju se u prisustvu askorbinske kiseline ili u reakciji sa LOOH, pri čemu ponovo nastaje slobodni peroksil radikal. Takođe, često u prisustvu Fe^{2+} i askorbinske kiseline, može da dođe do razgradnje LOOH do reaktivnih aldehidnih proizvoda, kao što su malondialdehid (MDA), 4-hidroksi-2-nonenal, 4-hidroksi-2-heksenal, akrolein itd. Krajnji produkt lipidne peroksidacije MDA može da reaguje sa TBA, pri čemu nastaje obojeni kompleks čija apsorbancija može da se meri spektrofotometrijski na 532 nm.

Reagensi:

1. Laneno ulje: dobijeno iz lana ekstrakcijom po Soxlet-u
2. 0.035% rastvor masnih kiselina (MK): 35 μ L lanenog ulja i 250 μ L Tween-80 rastvoreno u 100.0 mL fosfatnog pufera pH 7.4 (ultrazvučno kupatilo, 90 min)
3. 4.58 mmol/L FeSO₄: 0.0127 g FeSO₄ × 7 H₂O rastvoreno u 10.0 mL dH₂O
4. 3.49 mmol/L Askorbinska kiselina - osnovni rastvor: 0.0615 g askorbinske kiseline rastvoreno u 100.0 mL dH₂O
5. 0.087 mmol/L askorbinska kiselina - radni rastvor: 10 μ L osnovnog rastvora 3.49 mmol/L askorbinske kiseline pomešano sa 390 μ L dH₂O
6. 3.72% EDTA: 1.86 g EDTA rastvoreno u 50.0 mL dH₂O
7. 0.067 mol/L fosfatni pufer pH 7.4: 1.7506 g KH₂PO₄ i 7.6851 g Na₂HPO₄ rastvoreno u 1000.00 mL dH₂O
8. TBA reagens: 3.0 g TBA , 120.0 g TCA i 10.4 mL HClO₄ rastvoreno u 800.0 mL dH₂O
9. Početne koncentracije ispitivanih uzoraka
 - ekstrakata: *J. foetidissima*/iglice i šišarke, *J. oxycedrus*/iglice i šišarke, *J. sabina*/iglice i šišarke i *J. phoenicea*/iglice i šišarke 1.25, 2.5, 10.0, 40.0, 100.0 i 200 mg/mL; *J. excelsa*/iglice 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0 i 100.0 mg/mL; *J. communis*/iglice i šišarke, *J. macrocarpa*/iglice i šišarke, *J. excelsa*/šišarke, *J. sibirica*/iglice i šišarke 10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 100.0 i 200.0 mg/mL.
 - etarskih ulja: *J. communis*/iglice 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0 i 50.0 μ L/mL; *J. foetidissima*/iglice i šišarke, *J. oxycedrus*/šišarke i *J. sabina*/iglice i šišarke 2.5, 5.0, 10.0, 50.0, 125.0 i 250.0 μ L/mL; *J. oxycedrus*/iglice 2.5, 5.0, 10.0, 50.0, 125.0 i 500.0 μ L/mL; *J. phoenicea*/šišarke 2.5, 10.0, 50.0, 125.0, 250.0 i 500.0 μ L/mL; *J. communis*/šišarke, *J. macrocarpa*/iglice i šišarke, *J. excelsa*/šišarke i iglice, *J. sibirica*/iglice 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 125.0 i 250.0 μ L/mL; *J. phoenicea*/iglice 5.0, 10.0, 50.0, 125.0, 250.0 i 500.0 μ L/mL.
 - standarda: BHA i BHT 0.62, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0 i 20.0 mg/mL

Postupak:

Od ekstrakta početne koncentracije 0.2 g/mL napravljena je serija od šest razblaženja, tako da je dobijen raspon početnih koncentracija ekstrakta 1.25-200.0 mg/mL, u zavisnosti od ekstrakta. Etarska ulja korišćena su u rasponu koncentracija 0.5-500.0 µL/mL, dok su standardni antioksidanti BHA i BHT korišćeni u rasponu koncentracija 0.62-20.0 mg/mL. Sve radne probe i kontrole obavljene su u tri ponavljanja.

Pripremljeni su odgovarajući rastvori (*Tabela 3.9.*) i inkubirani 60 min na 37 °C. Nakon dodatka 3.72% EDTA i TBA reagensa, smeša je zagrevana 15 min na 100 °C, a zatim ohlađena do sobne temperature i centrifugirana tokom 15 min na 3500 o/min. Apsorbancija rastvora merena je spektrofotometrijski na 532 nm.

Tabela 3.9. Rastvori pripremljeni za određivanje inhibicije lipidne peroksidacije

Radna proba	Korekcija	Kontrola	Korekcija kontrole
3.0 mL 0.035% rastvor MK	3.04 mL pufer pH 7.4	3.0 mL 0.035% rastvor MK	3.04 mL pufer pH 7.4
20 µL 4.58 mmol/L FeSO ₄	20-100 µL ekstrakt/etarsko ulje/standard	20 µL 4.58 mmol/L FeSO ₄	20-100 µL 80% MeOH
20 µL 0.087 mmol/L askorbat		20 µL 0.087 mmol/L askorbat	
20-100 µL ekstrakt/etarsko ulje/standard		20-100 µL 80% MeOH	
<i>Inkubacija 60 min na 37 °C</i>			
200 µL 3.72% EDTA	200 µL 3.72% EDTA	200 µL 3.72% EDTA	200 µL 3.72% EDTA
2.0 mL TBA reagens	2.0 mL TBA reagens	2.0 mL TBA reagens	2.0 mL TBA reagens
<i>Zagrevanje 15 min na 100 °C</i>			
<i>Centrifugiranje 15 min na 3500 o/min</i>			

Iz razlike apsorbcije radne probe (A_{rp}) i korekcije (A_{kor}) izračunate su apsorbcije (A) za svaku koncentraciju ispitivanog ekstrakta i etarskog ulja, kao i za kontrolu:

$$A = A_{rp} - A_{kor}$$

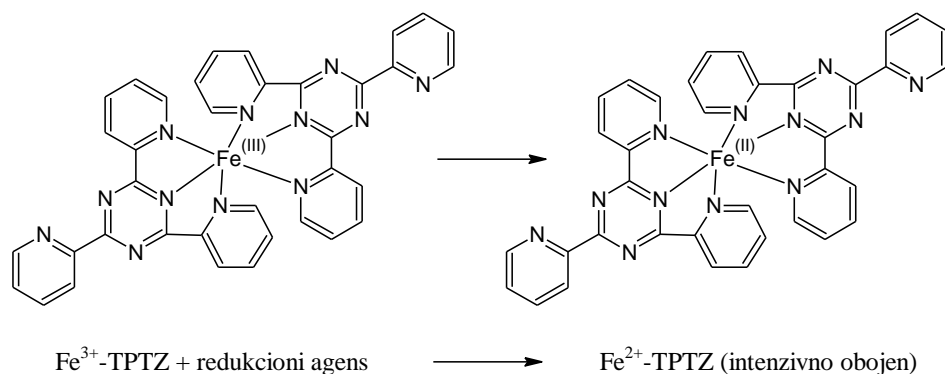
Inhibicija lipidne peroksidacije ekstrakata ili etarskih ulja različitih koncentracija (I_{LP}) je računata na osnovu sledeće jednačine, gde je A_{kon} apsorbancija kontrolne probe (razlika između apsorbancije kontrole i korekcije kontrole):

$$I_{LP} (\%) = (1 - A/A_{kon}) \times 100\%$$

Na osnovu I_{LP} vrednosti, određene su IC_{50} vrednosti (koncentracija pri kojoj je neutralisano 50% radikala) očitavanjem sa odgovarajućeg grafika (funkcija $I_{LP} (\%)$ u zavisnosti od radne koncentracije), a rezultat je izražen kao srednja vrednost tri određene IC_{50} vrednosti \pm standardna devijacija ($\mu\text{g/mL}$, $\mu\text{L/mL}$).

3.4.6. Određivanje redukcionog potencijala (FRAP test)

Određivanje redukcionog potencijala ispitivanih ekstrakata urađeno je po metodi Benzie-a i Strain-a (1996), prilagođenoj za mikroploče. Pri niskoj pH vrednosti, može da dođe do redukcije gvožđe(III)-2,4,5-tripiridil-s-triazin kompleksa u obojeni gvožđe(II)-2,4,5-tripiridil-s-triazin kompleks, čija se apsorbancija može da se meri spektrofotometrijski na 593 nm (Slika 3.8.).



Slika 3.8. Reakcija primenjena u FRAP testu

Reagensi:

1. 10.0 mmol/L 2,4,5-tripiridil-s-triazin (TPTZ) u 40 mmol/L HCl: 0.0156 g TPTZ rastvoreno u smeši 4.993 g dH₂O i 0.017 mL 36% HCl
2. 0.02 mol/L FeCl₃: 0.0270 g FeCl₃ × 6 H₂O rastvoreno u 5.0 mL dH₂O

3. Acetatni pufer pH 3.6: 0.1550 g $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3 \text{H}_2\text{O}$ i 0.80 mL glac. CH_3COOH dopunjeno do 50 mL dH_2O
4. FRAP reagens: 10.0 mmol/L TPTZ : 0.02 mol/L FeCl_3 : acetatni pufer pH 3.6 pomešani u odnosu 5:5:50 neposredno pre merenja
5. 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ askorbinska kiselina: 0.05 g askorbinske kiseline rastvoreno u 250.0 mL dH_2O

Razblaženja askorbinske kiseline za standardnu krivu data su u *Tabeli 3.10.*:

Tabela 3.10. Razblaženja askorbinske kiseline korišćena za izradu standardne krive

Početna koncentracija askorbata ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	160	140	120	100	80	60	40	20	10	5	2.5	1.25
Zapremina osnovnog rastvora 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ askorbata (μL)	160	140	120	100	80	60	40	20	10	10	100*	100*
Zapremina dH_2O (mL)	40	60	80	100	120	140	160	180	190	390	100	300

*koncentracije 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$

6. Početne koncentracije ispitivanih ekstrakata:

- . *J. communis*/igice i šišarke, *J. macrocarpa*/igice i šišarke, *J. excelsa*/igice i šišarke, *J. sibirica*/igice i šišarke, *J. foetidissima*/iglice i šišarke, *J. oxycedrus*/iglice, *J. sabina*/iglice i šišarke i *J. phoenicea*/iglice 0.5, 1.0 i 2.0 mg/mL
- . *J. oxycedru*/šišarke i *J. phoenicea*/šišarke 2.0, 4.0 i 8.0 mg/mL

Postupak:

Razblaženja askorbinske kiseline za standardnu krivu napravljena su u rasponu koncentracije od 1.25 do 160.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Osnovni rastvor ekstrakata razblažen je do početnih koncentracija od 0.5, 1.0 i 2.0 mg/mL ili 2.0, 4.0 i 8.0 mg/mL. Sve radne probe rađene su u tri ponavljanja. Pripremljeni rastvori prikazani su u *Tabeli 3.11.*, a njihova apsorbancija merena je spektrofotometrijski (593 nm) nakon šest minuta.

Tabela 3.11. Rastvori pripremljeni za određivanje redukcionog potencijala

Radna proba	Korekcija	Slepa proba	Korekcija slepe probe
290 μ L FRAP reagens	290 μ L dH ₂ O	290 μ L FRAP reagens	290 μ L dH ₂ O
10 μ L ekstrakt	10 μ L ekstrakt	10 μ L 80% MeOH	10 μ L 80% MeOH

Iz razlike apsorbancije srednje vrednosti radnih proba (A_{sr}) i korekcije (A_{kor}) i slepe probe (A_{sp}) i korekcije slepe probe (A_{korsp}), izračunate su apsorbancije (A) za svaki ispitani ekstrakt:

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

Redukcioni potencijal izračunat je na osnovu kalibracione krive (funkcija apsorbancije u zavisnosti od koncentracije) standardnog rastvora askorbinske kiseline. Rezultat je izražen kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija (miligram-ekvivalenta askorbinske kiseline po gramu suvog ekstrakta).

3.4.7. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola određen je po spektrofotometrijskoj metodi Singleton-a i saradnika (1999), prilagođenoj za mikroploče. Ova metoda zasniva se na osobini fenola da u reakciji sa Folin-Ciocalteu-ovim reagensom (smeša Na₂WO₄, Na₂MoO₄, HCl, H₃PO₄ i LiSO₄) daju obojeni kompleks, čija apsorbancija se meri na 760 nm.

Reagensi:

1. 0.1 mol/L Folin-Ciocalteu reagens (FC reagens): 1.25 mL 2M FC reagensa razblaženo destilovanom vodom do 25.0 mL
 2. 75 g/L Na₂CO₃: 1.875 g Na₂CO₃ rastvoreno u 25.0 mL dH₂O
 3. 1 mg/mL Galna kiselina: 0.0276 g galne kiseline \times 1 H₂O rastvoreno u 25.0 mL dH₂O
- Razblaženja galne kiseline za standardnu krivu data su u *Tabeli 3.12*.

Tabela 3.12. Razblaženja galne kiseline korišćena za izradu standardne krive

Početna koncentracija galne kis. ($\mu\text{g/mL}$)	80	60	50	40	30	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0
Zapremina osnovnog rastvora 1 mg/mL galne kiseline (mL)	40	30	25	20	15	10	10	10	10	10	10	0
Zapremina vode (mL)	460	470	475	480	485	490	990	1990	3990	7990	16990	500

4. Početne koncentracije ispitivanih ekstrakata:

- *J. communis*/iglice i šišarke, *J. macrocarpa*/iglice, *J. excelsa*/iglice i šišarke, *J. sibirica*/iglice i šišarke, *J. foetidissima*/iglice i šišarke, *J. oxycedrus*/iglice i šišarke, *J. sabina*/iglice i šišarke i *J. phoenicea*/iglice i šišarke 125, 250 i 500 $\mu\text{g/mL}$
- *J. macrocarpa*/šišarke 1000, 2000 i 4000 $\mu\text{g/mL}$

Postupak:

Razblaženja galne kiseline za standardnu krivu napravljena su u rasponu koncentracije od 0.625 do 80 $\mu\text{g/mL}$. Osnovni rastvor ekstrakata razblažen je do početnih koncentracija od 125, 250 i 500 $\mu\text{g/mL}$ ili 1000, 2000 i 4000 $\mu\text{g/mL}$. Sve radne probe obavljene su u tri ponavljanja. Pripremljeni rastvori prikazani su u Tabeli 3.13., a njihova apsorbancija merena je spektrofotometrijski (760 nm) nakon dva časa.

Tabela 3.13. Rastvori pripremljeni za određivanje sadržaja ukupnih fenola

Radna proba	Korekcija	Slepa proba	Korekcija slepe probe
30 μL ekstrakt	30 μL ekstrakt	30 μL rastvarač (80% MeOH)	30 μL rastvarač (80% MeOH)
150 μL 0.1 mol/L FC reagens	150 μL dH ₂ O	150 μL 0.1 mol/L FC reagens	150 μL dH ₂ O
120 μL 75 g/L Na ₂ CO ₃ *	120 μL 75 g/L Na ₂ CO ₃ *	120 μL 75 g/L Na ₂ CO ₃ *	120 μL 75 g/L Na ₂ CO ₃ *

* rastvor je dodat 10 min nakon dodavanja FC reagensa

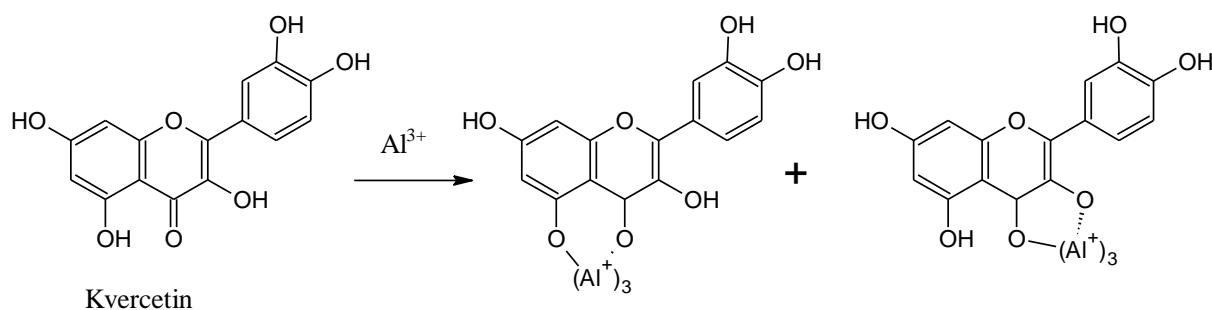
Iz razlike apsorbancije srednje vrednosti radnih proba (A_{sr}) i korekcije (A_{kor}) i slepe probe (A_{sp}) i korekcije slepe probe (A_{korsp}), izračunate su apsorbancije (A) za svaki ispitani ekstrakt:

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

Sadržaj fenola izračunat je na osnovu kalibracione krive (funkcija apsorbancije u zavisnosti od koncentracije) standardnog rastvora galne kiseline. Rezultat je izražen kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija (miligram-ekvivalenta galne kiseline po gramu suvog ekstrakta).

3.4.8. Određivanje sadržaja flavonoida

Sadržaj flavonoida određen je po spektrofotometrijskoj metodi Chang-a i saradnika (2002), prilagođenoj za mikroploče. Naime, flavonoidi i flavonglikozidi sa metalima daju odgovarajuće metalokomplekse. Naročito je značajan Al-kompleks (Slika 3.9.), jer se Al^{3+} vezuje za ukupne flavonoide, pa se sumarni apsorpcioni maksimum lako određuje.



Slika 3.9. Nastajanje obojenog kompleksa Al^{3+} jona i flavonoida

Reagensi:

1. 0.75 mol/L AlCl_3 : 4.5266 g $\text{AlCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ rastvoreno u 25.0 mL dH_2O
 2. 1 mol/L CH_3COONa : 3.402 g $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3 \text{ H}_2\text{O}$ rastvoreno u 25.0 mL dH_2O
 3. 1 mg/mL Kvercetin: 0.0264 g kvercetin $\times \text{H}_2\text{O}$ rastvoreno u 25.0 mL 80% metanola
- Razblaženja kvercetina za standardnu krivu data su u *Tabeli 3.14.*:

Tabela 3.14. Razblaženja galne kiseline korišćena za izradu standardne krive

Početna koncentracija kvercetina ($\mu\text{g/mL}$)	80	60	50	40	30	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0
Zapremina osnovnog rastvora 1 mg/mL kvercetina (mL)	40	30	25	20	15	10	10	10	10	10	10	0
Zapremina 80% metanola (mL)	460	470	475	480	485	490	990	1990	3990	7990	16990	500

4. Početne koncentracije ispitivanih ekstrakata:

- . *J. communis*/iglice i šišarke, *J. macrocarpa*/iglice, *J. excelsa*/iglice i šišarke, *J. sibirica*/iglice i šišarke, *J. foetidissima*/iglice i šišarke, *J. oxycedrus*/iglice i šišarke, *J. sabina*/iglice i šišarke i *J. phoenicea*/iglice i šišarke 1.0, 2.0 i 4.0 mg/mL
- . *J. macrocarpa*/šišarke 5.0, 10.0 i 20.0 mg/mL

Postupak:

Razblaženja kvercetina za standardnu krivu napravljena su u rasponu koncentracije od 0.625 do 80.0 $\mu\text{g/mL}$. Osnovni rastvor ekstrakata razblažen je do početnih koncentracija od 1.0, 2.0 i 4.0 mg/mL ili 5.0, 10.0 i 20.0 mg/mL. Sve radne probe obavljene su u tri ponavljanja. Pripremljeni rastvori su prikazani u Tabeli 3.15., a njihova apsorbancija merena je spektrofotometrijski (415 nm) nakon trideset minuta.

Tabela 3.15. Rastvori pripremljeni za određivanje sadržaja flavonoida

Radna proba	Korekcija	Slepa proba	Korekcija slepe probe
30 μL ekstrakt	30 μL ekstrakt	30 μL rastvarač (80% MeOH)	30 μL rastvarač (80% MeOH)
90 μL MeOH	90 μL MeOH	90 μL MeOH	90 μL MeOH
6 μL 0.75 mol/L AlCl_3	6 μL H_2O	6 μL 0.75 mol/L AlCl_3	6 μL H_2O
6 μL 1 mol/L CH_3COONa	6 μL 1 mol/L CH_3COONa	6 μL 1 mol/L CH_3COONa	6 μL 1 mol/L CH_3COONa
170 μL H_2O	170 μL H_2O	170 μL H_2O	170 μL H_2O

Iz razlike apsorbancije srednje vrednosti radnih proba (A_{sr}) i korekcije (A_{kor}), i slepe probe (A_{sp}) i korekcije slepe probe (A_{korsp}), izračunate su apsorbancije (A) za svaki ispitani ekstrakt:

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

Sadržaj fenola izračunat je na osnovu kalibracione krive (funkcija apsorbancije u zavisnosti od koncentracije) standardnog rastvora kvercetina. Rezultat je izražen kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija (miligram-ekvivalenta kvercetina po gramu suvog ekstrakta).

3.5. Određivanje antiinflamatornog potencijala

3.5.1. Određivanje broja trombocita

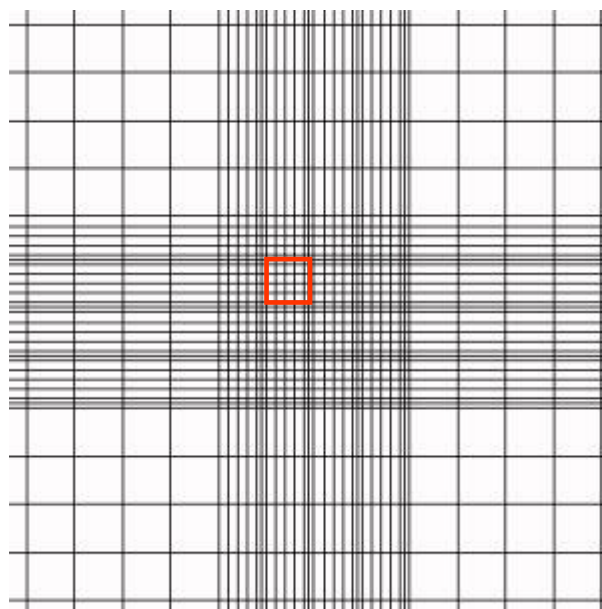
Trombociti, koji su korišćeni u eksperimentu, dobijeni su sa Instituta za transfuziju u Novom Sadu. Dobijani trombociti nalazili su se u specijalnim kesama koje predstavljaju koncentrat trombocita. Iako zastareli (nakon 5 dana) za medicinsku upotrebu, trombociti su i dalje vijabilni, samo je njihov broj smanjen. Trombociti se čuvaju, uz neprestano blago mešanje, na temperaturi od 20 °C do 24 °C. Tačan broj trombocita određivan je brojanjem u Neubauer-ovoj komori nakon tretiranja trombocita 1% amonijum-oksalamatom, pri čemu se pod mikroskopom vijabilni trombociti uočavaju kao svetlučave čestice.

Rastvor trombocita, koji se koristi pri brojanju, napravljen je mešanjem 10 μ L koncentrata trombocita i 990 μ L 1% rastvora amonijum-oksalata, pri čemu se dobija razblaženje od 100 puta. Pre brojanja, potrebno je da rastvor za brojanje odstoji 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon 10 min, 10 μ L pripremljenog rastvora nanosi se u Neubauer-ovu komoru, preko označenog mesta, koje je predhodno prekriveno pokrovnim staklom. Nakon nekoliko minuta, kada se trombociti „umire“, vrši se brojanje u odabranim kvadratićima u centralnom kvadratu, najmanje četiri puta, na mikroskopskom uvećanju od 40 puta. Na *Slici 3.10.* prikazana je Neubauer-ova komora pod mikroskopom, sa naznačenim jednim kvadratićem u kome se broje trombociti. Po nalasku dobre slike, pod mikroskopom se broje trombociti koji svetlucaju. Pri brojanju, uzimaju se u obzir trombociti u samom kvadratiću i

trombociti koji se nalaze na dve odabrane strane kvadratića (npr. desna i donja strana, ili leva i gornja strana). Isti princip koristi se za svaki kvadratić koji se odabere za brojanje.

Broj trombocita određuje se formulom koja je formirana na osnovu dimenzija komore i razblaženja trombocita. Visina komore iznosi 0.1 mm, dok površina jednog kvadratića u kom se broje trombociti iznosi 0.04 mm^2 , tako da je zapremina u kojoj se broje trombocita $4 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$ tj. $4 \times 10^{-6} \text{ mL}$. Ako se u formulu uvrsti taj podatak kao i razblaženje, dobija se krajnji izraz:

$$\text{broj trombocita/mL} = (\text{srednja vrednost izbrojanih trombocita} \times \text{razblaženje (100)}) / (4 \times 10^{-6})$$



Slika 3.10. Izgled Neubauer-ovu komore pod mikroskopom
(http://www.carlroth.com/media/_en-de/Graphics/00001910_0.jpg, maj 2011)

3.5.2. Eksperimentalni postupak za određivanje antiinflamatorne aktivnosti

Određivanje antiinflamatorne aktivnosti ispitivanih ekstrakata, etarskih ulja i standardnih jedinjenja urađeno je po modifikovanoj metodi Beara-e i saradnika (2010). Metoda je zasnovana na određivanju sposobnosti inhibicije produkcije medijatora inflamacije, produkata metabolizma arahidonske kiseline, 12-HHT, TXB₂ i PGE₂ i enzima 12-LOX, u intaktnom ćelijskom sistemu (humanim trombocitima), gde je proces inflamacije izazivan dejstvom kalcijumove jonofore A23184 (kalcimicin).

Reagensi:

1. Pufer pH 7.2: 4.0033 g NaCl, 0.1006 g KCl, 0.1361 g KH₂PO₄, 0.8899 g Na₂HPO₄ × 2H₂O i 0.450 g glukoza monohidrata rastvoreno je u 500.0 mL dH₂O
2. 1.9 mmol/L A23187 (kalcimicin) - osnovni rastvor: 1.0 mg kalcimicina rastvoreno u 1.0 mL DMSO
3. 125 μmol/L A23187 (kalcimicin) – radni rastvor: 0.658 mL osnovnog rastvora kalcimicina (1.9 mmol/L) dopunjeno DMSO-m do 10.0 mL
4. 16.66 mmol/L CaCl₂: 0,0186 g CaCl₂ rastvoreno u 10.0 mL dH₂O
5. 1% HCOOH: 5 ml cc HCOOH pomešano sa 495.0 mL dH₂O
6. 0.1 mg/mL PGB₂ - osnovni rastvor: 1.0 mg PGB₂ rastvoren u 10.0 mL DMSO
7. 6 μg/mL PGB₂ - radni rastvor: 0.6 mL osnovnog rastvora PGB₂ dopunjeno DMSO-m do 10.0 mL
8. 1% (NH₄)₂C₂O₄: 1.1450 g (NH₄)₂C₂O₄ × H₂O rastvoreno u 100.0 mL dH₂O
9. Početne koncentracije ispitivanih uzoraka
 - ekstrakata: svih ispitivanih 10.0, 25.0, 50.0, 100.0, 200.0 i 300.0 mg/mL;
 - etarskih ulja: *J. macrocarpa*/iglice 0.001, 0.004, 0.008, 0.031, 0.125 i 0.250 μL/mL; *J. sabina*/šišarke 0.004, 0.008, 0.032, 0.125, 0.25 i 1.0 μL/mL; *J. phoenicea*/šišarke 0.005, 0.05, 0.25, 1.0, 10.0 i 50.0 μL/mL; *J. oxycedrus*/šišarke 0.03, 0.14, 0.28, 1.125, 2.25 i 5.0 μL/mL; *J. sabina*/iglice 0.05, 0.25, 1.0, 5.0, 25.0 i 50.0 μL/mL; *J. excelsa*/iglice 0.481, 1.875, 3.75, 7.5, 15.0 i 30.0 μL/mL; *J. communis*/iglice i šišarke, *J. excelsa*/šišarke, *J. sibirica*/iglice, *J. foetidissima*/iglice i šišarke, *J. oxycedrus*/iglice, *J. phoenicea*/iglice 0.8, 3.125, 6.25, 12.5, 25 i 50 μL/mL; *J. macrocarpa*/šišarke 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 i 30.0 μL/mL.
 - standarda: aspirin 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.3 i 0.6 mg/mL; kvercetin 0.156, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5 i 5.0 mg/mL

Postupak:

Od ekstrakta početne koncentracije 0.3 g/mL (DMSO) napravljena je serija od šest rastvora razblaženja, tako da je dobijen raspon početnih koncentracija ekstrakta 10-300.0 mg/mL. Od etarskih ulja napravljene su serije od šest razblaženja u rasponu 0.001-50.0 μL/mL, u zavisnosti od vrste etarskog ulja. Standardni inhibitori produkcije ispitivanih

metabolita arahidonske kiseline i enzima 12-LOX, aspirin, korišćen je u rasponu koncentracija 0.01-0.6 mg/mL, i kvercetin, u rasponu koncentracija 0.156-5.0 mg/mL.

Faze eksperimentalne procedure za određivanje inhibicije produkcije metabolita 12-HHT, TXB₂ i PGE₂ i enzima 12-LOX prikazane su u *Tabeli 3.16*.

Na osnovu odnosa površine pika metabolita (12-HHT, TXB₂, PGE₂ i 12-HETE) i površine pika internog standarda (PGB₂) dobijene su vrednosti R_{rp} (radna proba), R_{kor} (korekcija), R_{kon} (kontrola) i R_{sp} (slepa proba) za odgovarajuće probe, a inhibicija produkcije metabolita i enzima računata je sledećom jednačinom:

$$I (\%) = (1 - (R_{rp} - R_{kor}) / (R_{kon} - R_{sp})) \times 100\%$$

Na osnovu I vrednosti, određene su IC₅₀ vrednosti (koncentracija pri kojoj je aktivnost produkcije metabolita/enzima inhibirana 50%) očitavanjem sa odgovarajućeg grafika (funkcija I (%) u zavisnosti od radne koncentracije), a rezultat je izražen kao srednja vrednost tri određene IC₅₀ vrednosti ± standardna devijacija (mg/mL, odnosno nL/mL).

Tabela 3.16. Eksperimentalni postupak za određivanje inhibicije produkcije metabolita 12-HHT, TXB₂ i PGE₂ i enzima 12-LOX

Radna proba	Korekcija	Kontrola	Slepa proba
4 × 10 ⁸ trombocita u 2.0 mL pufera pH 7.2	4 × 10 ⁸ trombocita u 2.0 mL pufera pH 7.2	4 × 10 ⁸ trombocita u 2.0 mL pufera pH 7.2	4 × 10 ⁸ trombocita u 2.0 mL pufera pH 7.2
<i>Inkubacija 5 min na 37 °C uz blago mućkanje</i>			
0.1 mL ekstrakt/etarsko ulje/standard	0.1 mL ekstrakt/etarsko ulje/standard	0.1 mL DMSO	0.1 mL DMSO
0.1 mL 125 µmol/L A23187	0.1 mL DMSO	0.1 mL 125 µmol/L A23187	0.1 mL DMSO
<i>Inkubacija 2 min na 37 °C uz blago mućkanje</i>			
0.3 mL 16.66 mmol/L CaCl ₂	0.3 mL dH ₂ O	0.3 mL 16.66 mmol/L CaCl ₂	0.3 mL dH ₂ O
<i>Inkubacija 5 min na 37 °C uz blago mućkanje</i>			
5.8 mL 1% HCOOH (4°C)*	5.8 mL 1% HCOOH (4°C)*	5.8 mL 1% HCOOH (4°C)*	5.8 mL 1% HCOOH (4°C)*
50 µL 6 µg/mL PGB ₂	50 µL 6 µg/mL PGB ₂	50 µL 6 µg/mL PGB ₂	50 µL 6 µg/mL PGB ₂
8.0 mL smeše CHCl ₃ :MeOH (1:1)	8.0 mL smeše CHCl ₃ :MeOH (1:1)	8.0 mL smeše CHCl ₃ :MeOH (1:1)	8.0 mL smeše CHCl ₃ :MeOH (1:1)
<i>Ekstrakcija (intenzivno mućkanje, Vortex) 15 min</i>			
<i>Centrifugiranje 7012 × g, 15 min na 4 °C</i>			
<i>Odvajanje organskog sloja</i>			

Uparavanje
Rastvaranje suvog ostatka u 0.5 mL MeOH
Cedenje preko milipor filtera
LC-MS/MS analiza

* u slučaju da se formira gel, smeša se, pre dodatka 1% HCOOH, intenzivno mučka (Vortex) do tečnog stanja

Optimizovani LC-MS/MS parametri:

Za hromatografsko razdvajanje korišćena je Zorbax SB-C18 30 mm × 2.1 mm × 3.5 μm (Agilent Technologies) reversno-fazna kolona pri temperaturi od 65 °C. Binarna mobilna faza sastojala se od 0.6% sirćetne kiseline (A) i metanola (B), a protok je iznosio 1.0 mL/min. Primenjen je gradijentni mod, koji je podrazumevao sledeći odnos faza: 0.0 min 65% B, 2.0 min 100% B, 3.5 min 100% B, sa post-vremenom od 3.0 min. Injektovana zapremina svih uzoraka bila je 5 μL. ESI parametri bili su: gas za sušenje (N₂) temperature 350 °C, protok 9 L/min, pritisak gasa nebulajzera 40 psi i napon na kapilari 4 kV, a ostali optimizovani parametri prikazani su u *Tabeli 3.17*. Kvantifikacija jedinjenja urađena je u negativnom MRM modu.

Tabela 3.17. Optimizovani parametri za kvantifikaciju 12-HHT, TXB₂, PGE₂, 12-HETE i PGB₂

Jedinjenje	Mod	Polaritet jona	Jonska vrsta	Jon prekursor (m/z)	Jon proizvod (m/z)	Kolizijska energija (V)	Napon fragmentora (V)
12-HHT	MRM	NI	[M-H] ⁻	279	261	5	120
TXB ₂	MRM	NI	[M-H] ⁻	369	169	15	120
PGE ₂	MRM	NI	[M-H] ⁻	351	271	15	120
12-HETE	MRM	NI	[M-H] ⁻	319	310	7	120
PGB ₂	MRM	NI	[M-H] ⁻	333	315	13	120

3.6. Određivanje antimikrobnog potencijala

3.6.1. Sojevi bakterija

U cilju utvrđivanja antimikrobne aktivnosti etarskih ulja iglica i šiškarki vrste roda *Juniperus* korišćeno je šest referentnih sojeva različitih vrsta bakterija: *Clostridium perfringens* ATCC (American Type Culture Collection) 13124, *Staphylococcus aureus*

ATCC 11632, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis (*S. enteritidis*) ATCC 13076, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 i *Acinetobacter baumannii* ATCC BAA-747. Sojevi su kultivisani na Mueller Hinton podlozi 24 časa na 37 °C. Od prekonoćnih kutura pripremane su suspenzije u fiziološkom rastvoru optičke gustine 0.5 MacFarland (approx. 1×10^8 CFU/mL). Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) etarskih ulja, pre inokulacije podloge, pripremljene suspenzije razblažene su prema potrebi.

3.6.2. Disk difuzioni test

U cilju preliminarnog ispitivanja efekta odabranih etarskih ulja na rast i razmnožavanje bakterija, primenjen je disk difuzioni metod (Prabuseenivasan i sar., 2006). Od prekonoćnih bakterijskih kultura pripremljene su bakterijske suspenzije u fiziološkom rastvoru (0.5 McF), Mueller Hinton podloga je inkulisana i nakon sušenja na sobnoj temperaturi u toku 30 minuta na njenu površinu postavljeni su inertni diskovi dijametra 6 mm. Etarska ulja pomešana su sa 10% rastvorom DMSO, u koji je prethodno dodato 0.5% Tween80 u cilju boljeg difundovanja ulja (v/v 1:1), i na disk je stavljano 25 µL ove smeše. Kao negativna kontrola služila je sterilna destilovana voda pomešana sa rastvaračem (v/v 1:1), a kao pozitivna, komercijalno proizvedeni disk ceftriaksona aktivnosti 30 µg i inertni disk impregniran sa rastvorom amikacina (30 µg po disku). Inkubacija je vršena 24 h na 37 °C, nakon čega je meren prečnik zone inhibicije. Testovi su izvedeni u tri nezavisna eksperimenta i dobijene zone predstavljene su kao srednja vrednosti ± standardna devijacija (mm). Etarska ulja *J. sibirica*/šišarke, *J. foetidissima*/šišarke i *J. oxyedrus*/šišarke nisu bila predmet ispitivanja antimikrobnog delovanja u okviru disk difuzione metode usled nedostatka etarskog ulja, odnosno nedovoljne količine koja je dobijena pri izolaciji. Takođe, etarska ulja *J. macrocarpa* iglica i šišarki i *J. communis* iglica i šišarki nisu ispitivana ovom metodom na pojedine bakterije, kako bi ostalo dovoljno materijala za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije.

3.6.3. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) etarskih ulja

Minimalna inhibitorna koncentracija odabranih ulja određena je agar dilucionim metodom (NCCLS, 1990) uz neznatne modifikacije. Sterilisani Mueller Hinton agar, sa dodatkom Tween 80 (0.5% v/v) u cilju boljeg rastvaranja i difundovanja etarskih ulja, prohladen je do temperature od 50 °C, a zatim je dodata odgovarajuća zapremina etarskog ulja u cilju dobijanja finalnih koncentracija ulja u podlozi: 16.0, 8.0, 4.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312, 0.016, 0.008 i 0.004 µL/mL. Ploče su ostavljene 30 minuta da se prosuše, a potom su inokulisane metodom kapi sa 1 µL 10 puta razblažene suspenzije 0.5 MacFarland (oko 1×10^4 CFU po jednoj kapi) određenog bakterijskog soja. Ploče su obavijene parafilmom i inkubirane od 18 do 24 časa na 37 °C, nakon čega je određivana minimalna inhibitorna koncentracija. Najmanja koncentracija ulja na kojoj je odsustvovao rast bakterija ili se pojavilo par pojedinačnih kolonija, uzimana je za minimalnu inhibitornu koncentraciju. Negativna kontrola podrazumevala je inokulaciju bakterija na podloge u koje je dodata odgovarajuća zapremina rastvarača i destilovane vode. Amikacin je korišćen kao pozitivna kontrola, pri čemu su se finalne koncentracije kretale od 0.125 do 32 µg/mL (0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 i 32.0 µg/mL). Sve kombinacije bakterija i koncentracija ispitivanih ulja rađene su u triplikatu i u tri nezavisna eksperimenta, sa izuzetkom ulja *J. macrocarpa*/iglice i *J. oxycedrus*/iglice, za koje je MIC određen iz dva nezavisna eksperimenta. Etarska ulja *J. sibirica*/šišarke i *J. foetidissima*/šišarke nisu bila predmet ispitivanja antimikrobnog delovanja u okviru određivanja minimalne inhibitorne koncentracije etarskih ulja, usled nedostatka etarskog ulja, odnosno zbog nedovoljne količine koja je dobijena pri izolaciji. Rezultati su predstavljeni kao najmanja koncentracija etarskog ulja (µL/mL) ili antibiotika (µg/mL) koja je inhibirala rast i razmnožavanje bakterija.

4. DISKUSIJA I REZULTATI

4.1. Fitohemijski skrining

4.1.1. LC-MS/MS skrining odabranih fenolnih jedinjenja

U cilju utvrđivanja razlika u kvalitativnom i kvantitativnom sadržaju 44 odabrana fenolna jedinjenja u matanolnim ekstraktima iglica i šišarki 8 vrsta roda *Juniperus*, primenjena je visoko selektivna i specifična LC-MS/MS tehnika (Poglavlje 3.2.). Fitohemijski skrining obuhvatao je analizu 14 fenolnih kiselina, 25 flavonoida, 3 kumarina i 2 lignana, od kojih je većina detektovana po prvi put u ispitivanim vrstama kleke. Rezultati skrininga fenolnih komponenti u ispitivanim vrstama kleke dati su u *Tabeli 8.1.*

LC-MS/MS analizom metanolnog ekstrakta iglica vrsta *J. communis* utvrđeno je prisustvo velikog broja ispitivanih fenolnih jedinjenja, od kojih se *p*-hidroksibenzoeva kiselina, vanilinska kiselina, siringinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, kafena kiselina, ferulna kiselina, 3,4-dimetoksicimetna kiselina, hlorogenska kiselina, amentoflavon, izoramnetin, kemferol, krizoeriol, naringenin i umbeliferon nalaze u najvećoj količini u poređenju sa ostalim ispitivanim ekstraktima. Takođe, u ovom ekstraktu, značajno se ističe sadržaj flavonoida rutina (103.83 mg/g s. e.), katehina (103.27 mg/g s. e.), amentoflavona (26.29 mg/g s. e.), epikatehina (14.26 mg/g s. e.) i kumarina, umbeliferona (38.104 mg/g s. e.). Ekstrakt šišarki iste vrste odlikuje se siromašnim sadržajem ispitivanih fenolnih komponenti u poređenju kako sa ekstraktom iglica, tako i sa ostalim ekstraktima. Od svih ispitivanih fenola, samo se katehin nalazi u umerenoj količini (4.13 mg/g s. e.), dok je sadržaj ostalih detektovanih fenolnih jedinjenja uglavnom znatno manji od 1 mg/g s.e. Pregled dostupne literature pokazuje da o fenolnom sastavu iglica ove vrste ne postoji ni jedan navod, dok svega tri publikacije daju podatke o fenolnim komponentama u ekstraktima šišarki (Innocenti i sar., 2007; Miceli i sar., 2009; Kilic i sar., 2011). Innocenti i saradnici (2007) su utvrdili višestruko manje prisustvo apigenina i sličan sadržaj amentoflavona u ekstraktu šišarki, dok su Miceli i saradnici (2009) takođe detektovali znatno manje količine apigenina i znatno veće količine amentoflavona u poređenju sa rezultatima ove teze. Rezultati Kilic i

saradnika (2011) nisu u skladu sa dobijenim rezultatima za sadržaj *p*-hidroksibenzojeve kiseline i katehina, budući da ova grupa autora pomenute flavonoide nije ni detektovala. Naša ispitivanja pokazala da ekstrakt šišarki *J. communis* ima nizak sadržaj *p*-hidroksibenzojeve kiseline i visok sadržaj katehina. Uočene razlike u količini detektovanih fenolnih jedinjenja su najverovatnije posledica različite tehnike izolacije i primenjene metode za analizu fenolnih frakcija. Takođe, ova neslaganja mogu ukazati i na to da sastav fenolnih komponenti nije u potpunosti kontrolisan na nivou gena, nego da na njega mogu imati uticaj i različiti ekološki faktori.

Ekstrakt iglica *J. macrocarpa* odlikuje se visokim sadržajem rutina (106.14 mg/g s. e.), katehina (29.47 mg/g s. e.), kvercitrina (15.15 mg/g s. e.), epikatehina (3.51 mg/g s. e.), amentoflavona (2.42 mg/g s. e.), dok je lignan sekoizolaricirezinol određen u najvećoj količini u ovom ekstraktu (1.58 mg/g s. e.). Metanolni ekstrakt šišarki vrste *J. macrocarpa* ima jednostavan sastav sa znatno manjim sadržajem većine fenolnih komponenti, a jedino se ističe količina biflavona, amentoflavona (3.68 mg/g s. e.). O fenolnom profilu vrste *J. macrocarpa* ne postoji ni jedan dostupan navod u literaturi i samim tim ovi rezultati po prvi svedoče o prisutnosti ovih sekundarnih metabolita u ispitivanoj vrsti.

Ekstrakti iglica i šišarki vrsta *J. excelsa* odlikuju se visokim sadržajem šest flavonoida: katehina (234.39 i 56.53 mg/g s. e.), kvercitrina (141.86 i 44.96 mg/g s. e.), epikatehina (11.13 i 7.36 mg/g s. e.), rutina (14.65 i 3.87 mg/g s. e.), apigenina (3.56 i 6.99 mg/g s. e.) i amentoflavona (4.93 i 1.09 mg/g s. e.). Najveći sadržaj katehina u ispitivanim ekstraktima detektovan je upravo u ekstraktu iglica *J. excelsa*, dok se ekstrakt šišarki odlikuje najvećim sadržajem lignana metaireziola, 4.94 mg/g s. e. Rezultati Kilic i saradnika (2011), koji su vezani za sadržaj ispitivanih fenola u ekstraktu šišarki *J. excelsa*, nisu u saglasnosti sa rezultatima ove teze. Naime, pomenuti autori nisu detektovali *p*-hidroksibenzojevu kiselinu, a katehin su odredili u četiri puta većoj količini. Kad se sagledaju sve ispitivane vrste roda *Juniperus*, ekstrakti ove vrste zauzimaju treće mesto po ukupnom sadržaju fenolnih komponenti, posle vrsta *J. communis* i *J. sibirica*.

Metanolni ekstrakt iglica vrste *J. sibirica* karakteriše najveći sadržaj rutina (198.72 mg/g s. e.) u poređenju sa drugim ekstraktima, kao i značajne količine katehina (146.44 mg/g s. e.), epikatehina (12.73 mg/g s. e.) i apigenina (8.99 mg/g s. e.). U ekstraktu šišarki određen je visok sadržaj rutina (22.95 mg/g s. e.), katehina (15.66 mg/g s. e.) i apigenina (13.21 mg/g s.

e.), dok je apigenin-7-*O*-glukozida detektovan u primetnoj količini (3.74 mg/g s. e.). Rezultati ove teze nisu u saglasnosti sa navodima Miceli-ja i saradnika (2009), koji su detektovali apigenin u znatno manjoj, a amentoflavon u nešto većoj količini u ekstraktu šišarki *J. sibirica*.

LC-MS/MS analizom utvrđen je fenolni profil metanolnih ekstrakata iglica i šišarki vrsta *J. foetidissima* i navedene komponente detektovane su u značajnim količinama: katehin (202.92 i 61.36 mg/g s. e.), kvercitrin (125.21 i 67.42 µg/g s. e.), epikatehin (78.39 i 24.36 mg/g s. e.), rutin (48.18 i 45.86 mg/g s. e.), kvercetin-3-*O*-glukozid (13.21 i 11.13 mg/g s. e.) i amentoflavon (7.64 i 0.86 mg/g s. e.). Najveći sadržaj epikatehina i kvercitrina, u poređenju sa ostalim ispitivanim ekstraktima, detektovan je u ekstraktu iglica *J. foetidissima*. Rezultati Kilic i saradnika (2011), koji su vezani za sadržaj odabranih fenola u ekstraktu šišarki *J. foetidissima*, nisu u saglasnosti sa rezultatima ove teze.

U ekstraktima vrste *J. oxycedrus* detektovani fenoli određeni su u zanemarljivim količinama u poređenju sa ostalim vrstama. U ekstraktu iglica *J. oxycedrus*, po detektovanoj količini izdvajaju se fenoli rutin (112.28 mg/g s. e.), epikatehin (6.14 mg/g s. e.) i katehin (58.30 mg/g s. e.), dok je u ekstraktu šišarki određena znatno manja količina pomenutih fenola. Kao i kod predhodno pomenutih vrsta, rezultati Kilic i saradnika (2011) nisu u saglasnosti sa dobijenim rezultatima.

Fenolni profil ekstrakata iglica i šišarki vrste *J. sabina* se međusobno značajno razlikuje, prvenstveno zbog toga što je u ekstraktu iglica detektovana veća količina dominantnih komponenti. U ekstraktu iglica određena je zapažena količina katehina (124.88 mg/g s. e.), kvercitrina (89.52 mg/g s. e.), rutina (58.41 mg/g s. e.), kvercetin-3-*O*-glukozida (15.06 mg/g s. e.), epikatehina (13.15 mg/g s. e.) i apigenina (4.77 mg/g s. e.). Sadržaj kvercetin-3-*O*-glukozida u ovom ekstraktu bio je najveći u odnosu na ostale ispitane vrste. Ekstrakt šišarki karakteriše visok sadržaj kvercitrina (31.03 mg/g s. e.), rutina (18.02 mg/g s. e.), apigenin-3-*O*-glukozida (6.86 mg/g s. e.), kvercetin-3-*O*-glukozida (5.76 mg/g s. e.) i apigenina (3.05 mg/g s. e.), pri čemu je sadržaj apigenin-7-*O*-glukozid prisutan u najvećoj količini u ovom ekstraktu.

Skrining odabranih fenolnih komponenti ekstrakata vrste *J. phoenicea* pokazao je jednostavan sastav, sa malom količinom ispitivanih jedinjenja u poređenju sa ostalim ekstraktima. U ekstraktu iglica, po količini se jedino izdvaja katehin (23.41 mg/g s. e.), dok

je u ekstraktu šišarki detektovana mala količina svih određivanih komponenti. Jedini dostupan navod u literaturi, koji govori o sastavu fenolnih komponenti u iglicama *J. phoenicea* (Maatooq i sar., 1998), je u saglasnosti sa rezultatima ove teze, s obzirom da su Maatooq i saradnici takođe potvrdili prisustvo kvercetina i kvercitrina. O fenolnom sastavu ekstrakta šišarki postoji samo jedan navod (Kilic i sar., 2011), čiji se rezultati, kao što je i ranije navedeno, ne slažu sa rezultatima ove teze u pogledu prisutne količine *p*-hidroksibenzojeve kiseline i katehina.

Fenolni profil odabranih vrsta *Juniperus* bio je predmet malobrojnih istraživanja, a pregled dostupnih podataka u literaturi dat je u *Tabeli 2.2*. Od 16 ispitivanih ekstrakata, za 8 postoje navodi u literaturi, i to za ekstrakte *J. communis*/šišarke, *J. excelsa*/šišarke, *J. sibirica*/šišarke, *J. foetidissima*/šišarke, *J. oxycedrus*/šišarke, *J. sabina*/iglice, *J. phoenicea*/iglice i šišarke (Abul'saeva i Pashinina, 1982; Maatooq i sar., 1998; 2005; Innocenti i sar., 2007; Miceli i sar., 2009; Kilic i sar., 2011), čiji rezultati uglavnom nisu u saglasnosti sa rezultatima ove teze. U pojedinim publikacijama postoje podaci samo o kvalitativnom, dok neke navode i kvantitativni sadržaj određenih fenolnih jedinjenja, iako se ni jedna od dostupnih studija nije detaljno bavila fenolnim sastavom vrsta koje su ispitivane u ovoj tezi. Poredeći rezultate sadržaja određenih fenola u ekstraktima iglica i šišarki iste vrste, u većini slučajeva, veći sadržaj ovih jedinjenja detektovan je u ekstraktu iglice. Uopšteno, fenolne komponente koje se nalaze u značajnoj količini u ekstraktima vrsta roda *Juniperus* su kvercitrin, rutin, epikatehin i katehin. Iako bi dominantno prisustvo ovih fenola moglo da ukaže na pripadnost određenoj klasi, ovi podaci nisu dovoljno specifični i ne mogu da posluže za tačnu klasifikaciju i određivanje kom flavonoidnom hemo-tipu pripadaju ispitivane vrste roda *Juniperus*. Međutim, imajući u vidu da kvercitrin, rutin, epikatehin i katehin imaju veliki biološki potencijal i ispoljavaju mnogobrojne pozitivne efekte, kao što su snažna antiinflamatorna, antiviralna i antikancerogena aktivnost, kao i pozitivan efekat na sprečavanje aterosklerotičnih lezija (Camuesco i sar., 2006; Tao i sar., 2007; Auclair i sar., 2009; Papież i sar., 2010), sadržaj ovih jedinjenja u ispitanim ekstraktima ukazuje na njihovu potencijalnu aktivnost i potrebu za daljim ispitivanjima njihovih bioloških i farmakoloških efekata. Uopšteno, dobijeni rezultati fenolnog skrininga mogu da budu od velike koristi u proceni lekovitosti vrsta *Juniperus*, imajući u vidu njihovu široku primenu u tradicionalnoj medicini i ishrani. Takođe, većina ispitanih vrsta može se smatrati potencijalnim izvorom

određenih fenolnih jedinjenja, jer ih sadrže u značajnim količinama i mogu biti iskorišćene kao sirovina za njihovo dobijanje.

Dobijeni rezultati fitohemijskog skrininga su izuzetno važni za karakterizaciju roda *Juniperus*, jer predstavljaju prve podatke o fenolnom sastavu većine ispitivanih vrsta i mogu se, uz izvesnu opreznost, koristiti i kao hemotaksonomski markeri. Naime, fenolna jedinjenja su pouzdaniji hemotaksonomski markeri od terpenoidnih komponenti, budući da sadržaj terpenoida u velikoj meri zavisi od ekoloških faktora. Međutim, izvesna neslaganja između podataka u literaturi i sadržaja fenola određenih u našim ispitivanjima, ukazuju na potrebu da se detaljnije ispita povezanost fenolnih jedinjenja i njihove upotrebe pri hemotaksonomskoj klasifikaciji i determinaciji vrsta roda *Juniperus*. Sa druge strane, činjenica da se sadržaj fenolnih jedinjenja iste vrste sa različitih lokaliteta može značajno razlikovati i u kvalitativnom i u kvantitativnom smislu, može biti pokazatelj da fenolni profil nije u potpunosti kontrolisan na nivou gena, nego da, takođe, delimično zavisi i od drugih, a posebno ekoloških faktora.

4.1.2. GC-MS analiza etarskih ulja

Hemijskom karakterizacijom etarskih ulja šišarki i iglica osam vrsta roda *Juniperus* L. primenom gasne hromatografije sa masenim detektorom (Poglavlje 3.3.), utvrđeno je prisustvo ukupno 77 različitih komponenti koje čine od 92.1 do 100% ukupnog sastava etarskih ulja (Tabela 8.2.). Ispitivana etarska ulja se značajno razlikuju u kvantitativnom i kvalitativnom sadržaju terpenoidnih jedinjenja, što je i očekivano, budući da su u okviru ove doktorske teze analizirani uzorci etarskih ulja iglica i šišarki osam vrsta kleke, koje su sakupljene na različitim lokalitetima, odnosno koje su rasle pod drugačijim ekološkim uslovima.

Etarsko ulje iglica vrste *J. communis* odlikuje se jednostavnim sastavom, gde monoterpenski ugljovodonici čine 89.8%, dok oksidovani monoterpeni čine 5.8% ukupnog sastava. Glavne komponente ovog etarskog ulja su: sabinen (36.3%), α -pinen (24.2%), limonen (7.4%) i 4-terpineol (4.8%). Etarsko ulje šišarki iste vrste ima malo složeniji sastav, ali je i kod njega najdominantnija komponenta α -pinen (36.6%), monoterpenski ugljovodonik koji je karakterističan za četinarske vrste. Pored α -pinena, kao dominantni monoterpenski

ugljovodonicu određeni su sabinen (18.6%) i β -mircen (8.6%). Kod šišarki, za razliku od iglica, značajan deo ukupnih terpena čine seskviterpeni, 19.1% ukupnog sastava, a najdominantniji su germakren D (6.2%) i germakren B (4.6%). Etarska ulja šišarki i iglica vrsta roda *J. communis* bila su predmet analiza mnogih istraživačkih grupa i postoje mnogobrojni podaci u literaturi o sastavu ove vrste različitog geografskog porekla (Tabela 2.3.). Navedeni rezultati prethodnih analiza, kao i rezultati dobijeni u okviru ispitivanja u ovoj tezi, ukazuju na velike razlike u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu terpenoidnih jedinjenja, što je najverovatnije posledica značajnog uticaja različitih ekoloških faktora na produkciju ovih sekundarnih metabolita.

Podaci dobijeni pri analizi sastava etarskih ulja iglica i šišarki vrste *J. macrocarpa* sa ostrva Hvar, Republika Hrvatska, za razliku od etarskih ulja iglica i šišarki vrste *J. communis*, ukazuju na male međusobne razlike. Naime, kod oba etarska ulja najzastupljeniji su monoterpeni ugljovodonicu (iglice 59.2%, šišarke 69.6%), gde je α -pinen najprisutniji (iglice 49.4%, šišarke 47.8%). Etarsko ulje iglica *J. macrocarpa*, odlikuje se visokim sadržajem ukupnih seskviterpena (28.9%), gde je germakren D najzastupljeniji seskviterpen (18.1%). Takođe, i šišarke imaju visok sadržaj ukupnih seskviterpena, 20.5%, a kao i kod iglica, germakren D je komponenta sa najvećom zastupljenošću - 13.5%. Etarska ulja *J. macrocarpa* su nedovoljno istražena, s obzirom na to da postoji samo jedan podatak u literaturi i to o sastavu iglica ove vrste (Adams, 2008), dok za šišarke, u trenutno dostupnoj literaturi, ne postoji ni jedan navod. Poredeći rezultate prikazane u Tabeli 8.2. sa Adams-ovim (2008.), primećuju se značajne razlike, uglavnom u kvantitativnom sastavu, pa se tako na primer, u ispitivanoj vrsti sa Hvara, najdominantniji seskviterpen germakren D nalazi u 38 puta većoj količini.

Etarsko ulje iglica *J. excelsa* odlikuje se visokim sadržajem ukupnih seskviterpena (41.5%), što predstavlja najveći sadržaj ove klase jedinjenja u svim etarskim uljima ispitivanih vrsta *Juniperus*. Najzastupljeniji seskviterpen je kedrol (37.4%), koji nije detektovan u ostalim etarskim uljima. Monoterpeni ugljovodonicu su zastupljeni u nešto većem procentu od seskviterpena, 52.1%, dok su najdominantnije komponente α -pinen (30.9%) i limonen (14.8%). Takođe, etarsko ulje šišarki ove vrste odlikuje se visokim sadržajem seskviterpena kedrola u poređenju sa ostalim etarskim uljima (7.7%). Sadržaj ukupnih monoterpenih ugljovodonika u etarskom ulju šišarki *J. excelsa* je veoma visok

89.6%, a dominantne komponente su, kao i kod iglica, α -pinen (76.7%) i limonen (5.8%). Među šesnaest ispitivanih etarskih ulja, sadržaj α -pinena u šišarkama *J. excelsa* je najveći. Etarska ulja vrste *J. excelsa* su detaljno ispitana i u literaturi postoje brojni podaci o sastavu etarskih ulja ove vrste koje su sakupljene na različitim delovima severne hemisfere (Tabela 2.3.). Kao i kod predhodno pomenutih etarskih ulja vrste *J. communis* i *J. macrocarpa* i kod vrste *J. excelsa*, poredeći postojeće i podatke dobijene u okviru prikazanih ispitivanja, primećuju se značajne razlike u kvantitativnom i kvalitativnom sastavu.

Etarsko ulje iglica vrste *J. sibirica* odlikuje se jednostavnim sastavom sa visokim sadržajem monoterpenskog ugljovodonika α -pinena koji iznosi 74.5% od ukupnog sadržaja terpenoida, koji je za ovo etarsko ulje određen u potpunosti (100%). Sastav etarskog ulja šišarki iste vrste je nešto kompleksniji i odlikuje ga sadržaj α -pinena od 50.1%, dok su kod ostalih najzastupljeniji terpeni germakren D (14.3%) i β -mircen (6.4%).

Sastav etarskih ulja vrste *J. foetidissima* nije do sada detaljno ispitivan, tako da su rezultati analize sastava iglica dostupni u samo dva navoda u literaturi (Tunalier i sar., 2002; Adams, 2008), a za šišarke u samo jednom (Tunalier i sar., 2002). Poredeći dobijene rezultate sa dostupnim podacima iz literature, primećuju se značajne razlike u kvantitativnom sastavu najzastupljenijih terpenskih komponenti. Etarsko ulje iglica *J. foetidissima* se odlikuje visokim sadržajem monoterpenskih ugljovodonika (73.2%), izuzetno niskim sadržajem α -pinena (3.4%), koji je veoma zastupljen u ostalim ispitivanim vrstama kleke. Dominantni monoterpenski ugljovodonici u iglicama su sabinen (39.9%), γ -terpinen (10.1%) i α -terpinen (6.7%), gde se γ - i α -terpinen, u poređenju sa ostalim ispitivanim etarskim uljima, nalaze u najvećem procentu. Takođe, ukupni sadržaj oksidovanih monoterpena je najviši u poređenju sa ostalim petnaest etarskih ulja i iznosi 18.6%, od kojih je najzastupljeniji 4-terpineol (17.0%). Etarsko ulje šišarki *J. foetidissima* karakteriše nešto složeniji sastav, a čine ga monoterpenski ugljovodonici (53.0%), oksidovani monoterpeni (8.2%) i diterpeni koji su zastupljeni u velikom procentu (19.3%). Kao i kod iglica, i ovde je sadržaj α -pinena niži u poređenju sa ostalim ispitivanim vrstama (3.5%), dok su sabinen (29.9%) i 4-terpineol (8.2%) zastupljeni u primetnom procentu. Ono što je karakteristično za šišarke ove vrste je sadržaj diterpena, koji su prisutni u velikom procentu, a najzastupljeniji su pojedinačno: abietadien (8.6%), 4-epi-abietal (8.5%) i abietol (3.2%), koji su takođe detektovani i u radu Tunalier-a i saradnika (2002), ali ne u tolikom procentu.

Etarska ulja iglica i šišarki vrste *J. oxycedrus* karakteriše jednostavan sastav, gde dominantne komponente pripadaju monoterpenskim ugljovodonicima (iglice 78.8%, šišarke 89.2%) i seskviterpenima (iglice 16.8%, šišarke 5.5%). Pojedinačno, najzastupljenije terpenke komponente iglica su β -mircen (43.2%), α -pinen (23.7%), germakren D (11.4%), limonen (9.7%) i δ -kadinen (3.0%). Iste terpenke komponente prisutne su u zapaženom procentu i u šišarkama: α -pinen (75.6%), limonen (8.1%), germakren D (3.7%), δ -kadinen (3.1) i β -mircen (2.3%). Etarsko ulje šišarki *J. oxycedrus* izdvaja se od ostalih ispitanih etarskih ulja kleke po visokom sadržaju α -pinena, dok se etarsko ulje iglica odlikuje visokim sadržajem β -mircena. Oba etarska ulja pokazuju visok sadržaj oksidovanog seskviterpena δ -kadinena, koji je samo u tragovima prisutan u nekim od ispitivanih etarskih ulja. Postoji veliki broj podataka u literaturi o sastavu etarskih ulja vrste *J. oxycedrus* (Tabela 2.3.), ali rezultati se ne mogu porediti zbog značajne razlike u sadržaju i prisutnosti pojedinih terpenkih komponenti.

Sastav etarskih ulja iglica i šišarki vrste *J. sabina* bio je predmet istraživanja u samo dva dostupna rada (Hernandez i sar., 1987; Adams, 2008). U okviru ove doktorske teze, u potpunosti je određen sastav etarskog ulja iglica (100%), kao i 98.9% sastava etarskog ulja šišarki vrste *J. sabina* sakupljene na teritoriji Republike Makedonije. Ispitivana etarska ulja karakteriše nešto drugačiji sastav od sastava ostalih ispitanih etarskih ulja. Sabinen je prisutan u velikom udelu kod oba etarska ulja (iglice 54.3%, šišarke 60.9%), dok su druge komponente prisutne u umerenoj količini: β -mircen (iglice 4.3%, šišarke 5.5%) i 4-terpineol (iglice 6.8%, šišarke 2.9%). U poređenju sa ostalim ispitivanim etarskim uljima, etarsko ulje iglica *J. sabina*, odlikuje se najvišim procentom oksidovanog monoterpena citronelala, 6.8%.

Etarska ulja iglica i šišarki vrste *J. phoenicea* odlikuju se visokim sadržajem monoterpenskih ugljovodonika (iglice 64.6%, šišarke 83.3%), od kojih su najzastupljeniji α -pinen (iglice 43.6%, šišarke 74.3%) i β -felandren (iglice 13.4%, šišarke 2.7%). Takođe, u ovim etarskim uljima seskviterpeni su prisutni u zapaženoj količini (iglice 21.8%, šišarke 14.2%), a pojedinačno najzastupljeniji su germakren D (iglice 8.3%, šišarke 7.3%) i *trans*-kariofilen (iglice 13.4%, šišarke 2.7%).

Uopšteno, na osnovu detaljne GC-MS analize etarskih ulja iglica i šišarki osam vrsta roda *Juniperus* sakupljenih na teritoriji Balkanskog poluostrva (Tabela 2.3.), može da se zaključi da se ispitivana etarska ulja odlikuju visokim sadržajem monoterpenskih ugljovodonika

(52.1-89.9%), gde su dominantne komponente α -pinen (2.4-76.7%), sabinen (0-54.3%), β -mircen (0.9-43.2%), limonen (0-14.8%) i 4-terpineol (0.2-17.0%). Posle monoterpenskih ugljovodonika, najprisutniji su seskviterpeni (1.5-41.5%), od kojih se ističe sadržaj germakrena D (0-18.1%). Ovi rezultati ukazuju da etarska ulja vrsta *Juniperus* imaju jednostavan terpeniski sastav i da se mogu smatrati izvorom dominantno prisutnih mono- i seskviterpena.

Hemijski sastav većine etarska ulja ispitivanih vrsta kleke bio je predmet velikog broja istraživanja, o čemu svedoči niz navoda iz literature (Tabela 2.3.). Poredeći dobijene rezultate sa tim podacima, primećuju se velike razlike u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu svih analiziranih etarskih ulja, a one su najverovatnije posledica uticaja različitih ekoloških faktora pod kojima su rasle ispitivane vrste. Naime, pored geografskog porekla, na sastav terpenoidnih jedinjenja u mnogome utiču i sastav zemljišta, broj sunčanih sati tokom godine, biljne vrste koje rastu u okolini, kao i sama tehnika izolovanja etarskih ulja. Takođe, doba godine, odnosno faza vegetacije u kojoj je sakupljen biljni material, ima izuzetan značaj za sastav etarskih ulja. Postoje podaci u literaturi koji ukazuju na to da etarsko ulje iste biljne vrste i jedinke, izolovano istom metodom, ali iz materijala sakupljenog u različitim vegetativnim fazama, može da se razlikuje u prisutnosti dominantne komponente α -pinena i do 5 puta (Shanjani i sar., 2010). Zbog velike varijabilnosti sadržaja istih komponenti u istoj biljnoj vrsti, sastav etarskih ulja ne može se koristiti kao pouzdani hemotaksonomski marker. Međutim, sastav etarskih ulja je značajan u kontekstu primene kleke u medicinske i kozmetičke svrhe, zatim u industriji, gde se etarska ulja kleke koriste kao sirovina, ali i u kulinarstvu, zbog toga što kvalitet preparata u mnogome zavisi od hemijskog sastava etarskih ulja. Iako o sastavu većine etarskih ulja kleka, osim šišarki *J. macrocarpa*, već postoje podaci u literaturi, dobijeni rezultati su izuzetno značajni u smislu evaluacije kvaliteta etarskih ulja vrsta *Juniperus* sa područja Balkana, budući da većina kleka koje rastu na ovoj teritoriji, do sada nije ispitivana. Međutim, za potpunu determinaciju sastava etarskih ulja kleka sa teritorije Balkanskog poluostrva, neophodno je nastaviti njihovu detaljnu hemijsku karakterizaciju i ispitati kako se menja sastav istih vrsta sa različitih lokaliteta, sakupljenih u različitom vegetacionom periodu, sa ciljem da se tačno utvrde uticaji različitih ekoloških faktora na terpenoidni profil.

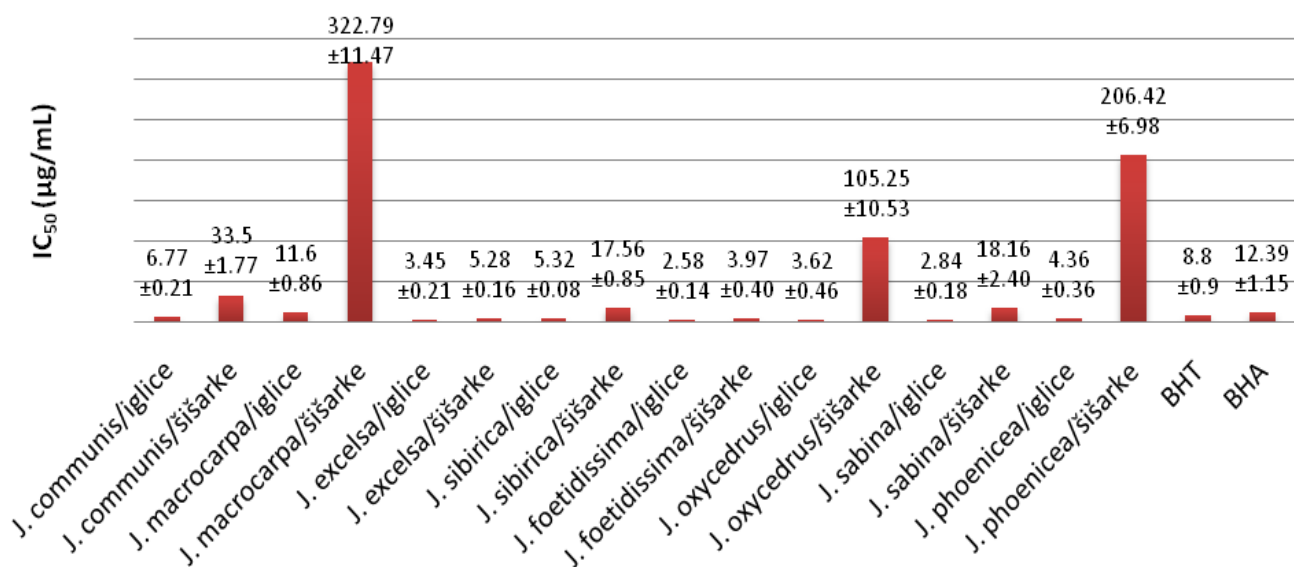
4.2. Antioksidantni potencijal

Reaktivne vrste kiseonika i azota su endogeni intermedijeri, koji neprekidno nastaju u organizmu i imaju dvojak uлогу. Pored važne uloge u regulaciji niza fizioloških procesa: kao signalni molekuli u procesu proliferacije, inflamacije i adhezije, fagocitozi, regulaciji ćelijskog rasta, sintezi biološki važnih jedinjenja i sl., povećan nivo slobodnoradikalnih vrsta dovodi do reakcija sa neradikalnim vrstama i narušavanja normalne homeostaze ćelije. Naime, slobodni radikali, kao što je navedeno u *Poglavlju 2.2.*, mogu da se adiraju na druge molekule i izazivaju razna oštećenja (npr. adicija HO[•] na DNK), mogu da abstrahuju proton (npr. iz ugljovodoničnog niza nezasićene masne kiseline iz ćelijskih membrana, izazivajući lipidnu peroksidaciju), mogu da budu redukujući (doniranje jednog elektrona) ili oksidativni (abstrakcija jednog elektrona) agensi, pri čemu nastaju nove radikalne vrste i zapravo započinje lančana reakcija. Ćelija poseduje sopstveni antioksidativni sistem koji ima ključnu ulogu u zaštiti od slobodnih radikala, odnosno u održavanju oksido-reduktivne ravnoteže u ćeliji. Taj sistem čine različiti endogeni proteini (vezuju metalne jone i na taj način sprečavaju katalizu, na primer, Fentonove reakcije), neproteinski biomolekuli (npr. askorbat, tokoferol) i enzimi (superoksid dizmutaza, glutation peroksidaza, peroksiredoksini i sl.) koji mogu da katalizuju prevođenje radikalnih u neradikalne vrste (Halliwell, 2006). Pored endogenih agenasa, koji štite ćeliju od oksidantnog oštećenja, egzogeni agensi u velikoj meri mogu da doprinesu zaštiti organizma. Kako se velika količina egzogenih agenasa u organizam unosi hranom, neophodno je odrediti antioksidantni kapacitet različitih biljaka, sa ciljem da se ishrana obogati vrstama koje su potentni „hvatači“ slobodnih radika, kao i efikasnost prirodnih antioksidanata pri zaštiti od oksidativnog oštećenja hrane. Naime, u pogledu ispitivanja hrane, određivanjem antioksidantnog statusa u biološkim sistemima može da se prati uticaj ishrane na oksidativni stres i doprinos u prevenciji bolesti čiji uzročnici su oksidativna oštećenja (Sánchez-Moreno, 2002). U skladu sa navedenim, i imajući u vidu široku primenu vrsta roda *Juniperus* u kulinarsvu kao začina i konzervansa, proizvodnji alkoholnih pića i primeni u tradicionalnoj medicini, u okviru ove teze ispitan je antioksidantni potencijal metanolnih ekstrakata i etarskih ulja iglica i šiškarki vrsta roda *Juniperus* primenom više standardnih spektrofotometrijskih metoda. Budući da su fenolna jedinjenja, posebno flavonoidi, grupa prirodnih proizvoda koji su izuzetno potentni

antioksidantni agensi, determinisan je njihov ukupni sadržaj u ispitanim ekstraktima, a zatim je urađena odgovarajuća regresiona analiza u cilju ispitivanja korelacije sadržaja ovih jedinjenja i antioksidantne aktivnosti.

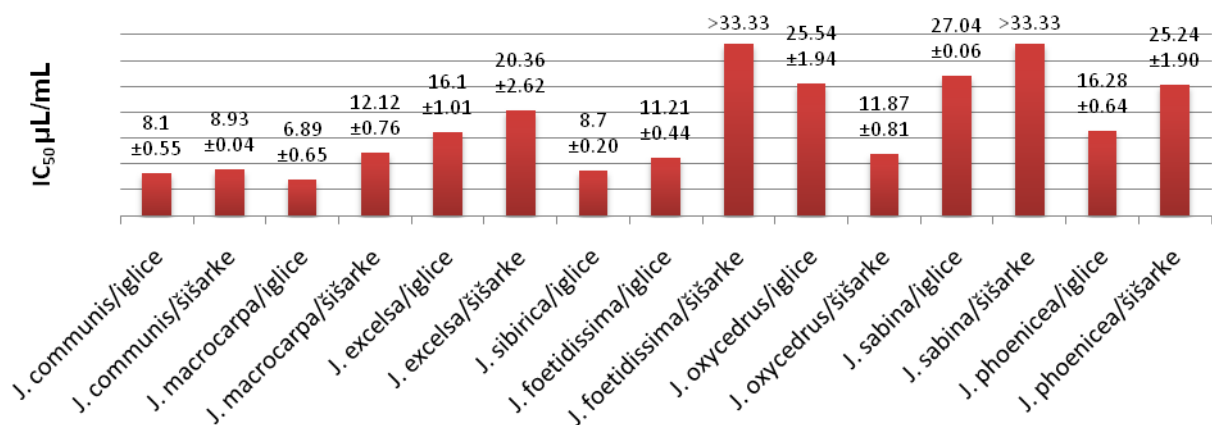
Antioksidantna aktivnost ispitanih ekstrakata određena je primenom testova koji su zasnovani na transferu elektrona (neutralizacija DPPH[•] radikala i određivanje redukcionne sposobnosti - FRAP test), neutralizaciji slobodnoradikalskih vrsta (kapacitet „hvatanja“ HO[•], O₂^{•-} i NO radikala) i potencijalu inhibicije lipidne peroksidacije (Poglavlje 3.4.). Takođe, uporedno su ispitane i odgovarajuće aktivnosti potentnih, sintetičkih antioksidanasa BHA i BHT, koji se vrlo često koriste kao aditivi (E320 i E321, redom), kako u hrani, tako i u farmaceutskim, kozmetičkim i raznim industrijskim proizvodima. Tabele sa rezultatima spektrofotometrijskih merenja i grafici sa kojih su očitane IC₅₀ vrednosti prikazani su u Poglavlju 8.2. (Tabele 8.3.-8.47. i Grafici 8.1.-8.42.).

Određivanje kapaciteta neutralizacije DPPH[•] radikala je metoda koja zbog svoje tačnosti, brzine i komercijalne dostupnosti DPPH reagensa ima široku primenu u ispitivanjima antioksidantnog potencijala prirodnih proizvoda. Na *Histogramu 4.1. i 4.2.* prikazane su IC₅₀ vrednosti (µg/mL i µL/mL) delovanja ekstrakta i etarskih ulja na neutralizaciju DPPH[•].



Histogram 4.1. Potencijal neutralizacije DPPH[•] radikala metanolnih ekstrakata iglica i šišarki vrsta roda *Juniperus*

IC₅₀ vrednosti ispitanih ekstrakata iznose od 2.58 (*J. foetidissima*/iglice) do 322.79 µg/mL (*J. macrocarpa*/šišarke) i ukazuju na to da 9 od 16 ispitivanih ekstrakata ima bolju sposobnost neutralizacije DPPH[•] radikala nego sintetički antioksidant BHA (IC₅₀ = 12.39 µg/mL). Takođe, statistički značajno bolju aktivnost (p<0.05) od BHT pokazalo je osam ekstrakata, *J. excelsa*/iglice i šišarke, *J. sibirica*/iglice, *J. foetidissima*/iglice i šišarke, *J. oxycedrus*/iglice, *J. sabina*/iglice i *J. phoenicea*/iglice, čije IC₅₀ vrednosti su bile manje od 8.8 µg/mL (IC₅₀ butilovanog hidroksitoluena). Kod svih ispitivanih ekstrakata, osim kod ekstrakata *J. foetidissima*, iglice su pokazale bolju aktivnost pri neutralizaciji DPPH[•] radikala u odnosu na šišarke.

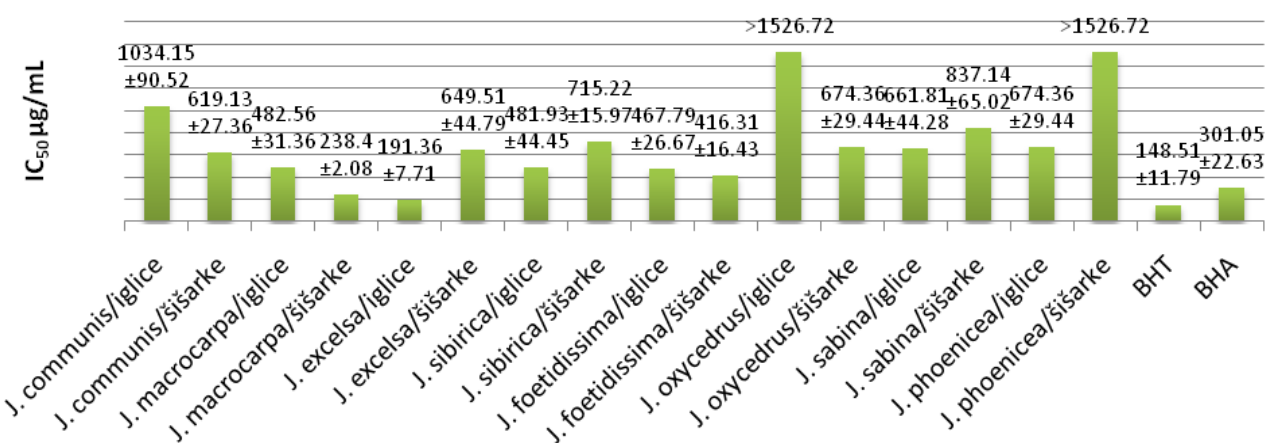


Histogram 4.2. Potencijal neutralizacije DPPH[•] radikala etarskih ulja iglica i šišarki vrsta roda *Juniperus*

Ispitivana etarska ulja vrsta roda *Juniperus* postižu neutralizaciju 50% DPPH[•] radikala pri koncentracijama od 6.89 (*J. macrocarpa*/iglice) do 27.04 µL/mL (*J. sabina*/iglice), dok samo dva etarska ulja nisu postigla IC₅₀ vrednost u ispitivanom opsegu koncentracija (*J. foetidissima*/šišarke i *J. phoenicea*/šišarke). U poređenju aktivnosti između iglica i šišarki iste vrste, sve iglice pokazuju bolji potencijal od odgovarajućih šišarki, osim kod vrste *J. oxycedrus*, gde je situacija obrnuta, pri čemu su razlike kod četiri vrste (*J. macrocarpa*, *J. foetidissima*, *J. sabina* i *J. phoenicea*) jasno izražene. IC₅₀ vrednost za ispitivane standarde BHT i BHA nije prikazana na *Histogramu 4.2.*, zbog značajne razlike u redu veličina IC₅₀ vrednosti standarda i etarskih ulja.

Pri poređenju rezultata aktivnosti ispitivanih ekstrakata i standarda sa etarskim uljima, važno je imati u vidu da masena koncentracija ekstrakata i standarda u mg/mL odgovara zapreminskoj koncentraciji etarskog ulja izraženoj u $\mu\text{L}/\text{mL}$. Uzimajući u obzir navedenu korelaciju, etarska ulja pokazala su znatno slabiju aktivnost od ekstrakata i standarda pri neutralizaciji DPPH[•] radikala, koja je najverovatnije posledica njihove loše rastvorljivosti u polarnim sistemima.

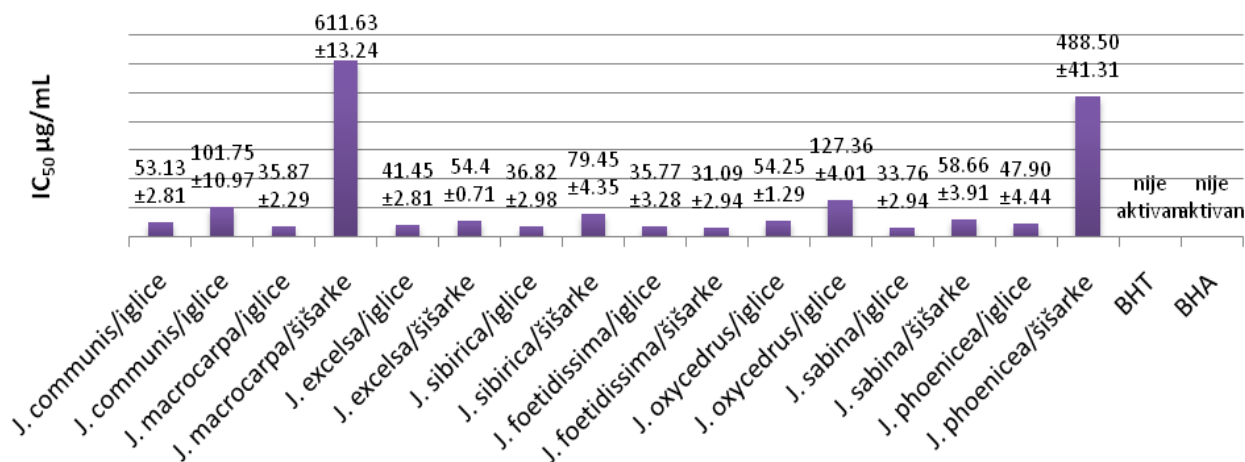
Kapacitet „hvatanja“ hidroksil radikala ispitivanih ekstrakata prikazan je na *Histogramu* 4.3.



Histogram 4.3. Potencijal neutralizacije HO[•] radikala ekstrakata iglica i šišarki vrste roda *Juniperus*

Najveći potencijal „hvatanja“ HO[•] radikala pokazao je ekstrakt *J. excelsa*/iglice, dostižući IC₅₀ vrednost pri koncentraciji od 191.36 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dok je najmanju izmerenu aktivnost ispoljio ekstrakt *J. communis*/iglice (IC₅₀ = 1034.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Ekstrakti *J. oxycedrus*/iglice i *J. phoenicea*/šišarke u ispitivanom opsegu koncentracije nisu postigli IC₅₀ vrednost. U poređenju sa BHT (IC₅₀ = 148.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ni jedan ekstrakt nije pokazao bolju aktivnost, dok je bolji potencijal od BHA (IC₅₀ = 301.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ispoljilo samo dva ekstrakta (*J. excelsa*/iglice i *J. macrocarpa*/šišarke) od šesnaest. Među dobijenim rezultatima ne može se uočiti zakonitost između aktivnosti ekstrakta iglica i šišarki iste biljne vrste. Pri radnoj koncentraciji od 15.625 do 1000.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ni jedno etarsko ulje iglica ili šišarki vrste roda *Juniperus* nije pokazalo koncentraciono-zavisnu aktivnost, što je najverovatnije posledica njihove slabe rastvorljivosti u vodi (puferskim sistemima).

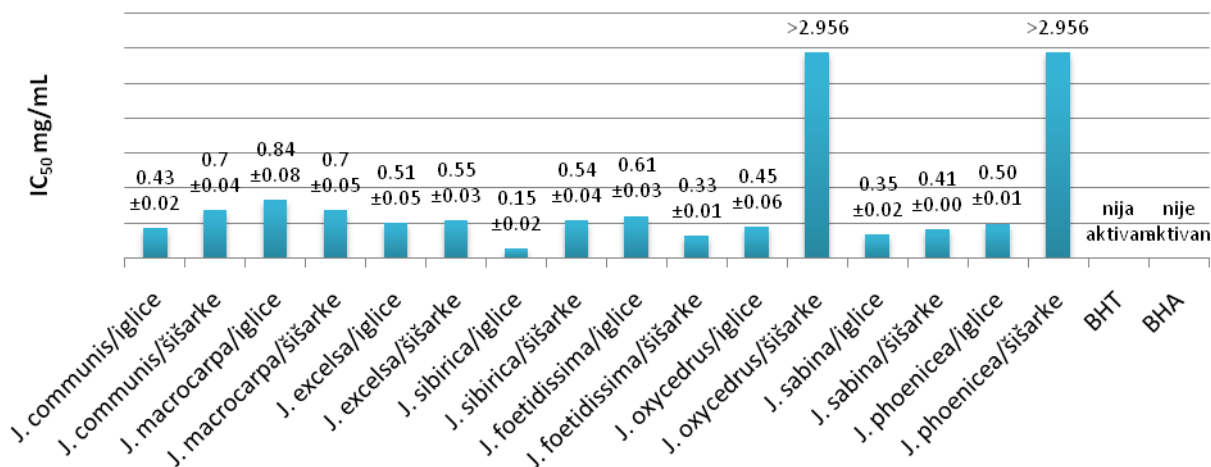
U pogledu sposobnosti „hvatanja“ $O_2^{\cdot-}$ radikala, svi ekstrakti odabranih vrsta roda *Juniperus* pokazali su značajnu aktivnost (Histogram 4.4.).



Histogram 4.4. Potencijal neutralizacije $O_2^{\cdot-}$ radikala ekstrakata iglica i šišarki vrste roda *Juniperus*

Odredene IC₅₀ vrednosti u pogledu „hvatanja“ $O_2^{\cdot-}$ radikala su u opsegu od 31.09 (*J. foetidissima*/šišarke) do 611.63 µg/mL (*J. macrocarpa*/šišarke). Kad se poredi aktivnost metanolnog ekstrakata iglica i šišarki iste vrste kleke, uočava se da kod sedam od osam ispitivanih vrsta, statistički značajno bolju aktivnost ($p < 0.05$) imaju ekstrakti iglica. Jedini izuzetak je vrsta *J. foetidissima*, gde neznatno veću aktivnost pokazuje ekstrakt šišarki. Pri radnoj koncentraciji od 15.625 do 1000.0 µL/mL ni jedno etarsko ulje iglica ili šišarki vrste roda *Juniperus* nije pokazalo koncentraciono-zavisnu aktivnost, kao ni standardni antioksidanti BHT i BHA pri radnoj koncentraciji od 0.62 do 20.0 mg/mL, što je najverovatnije posledica njihove slabe rastvorljivosti u vodi (puferskim sistemima).

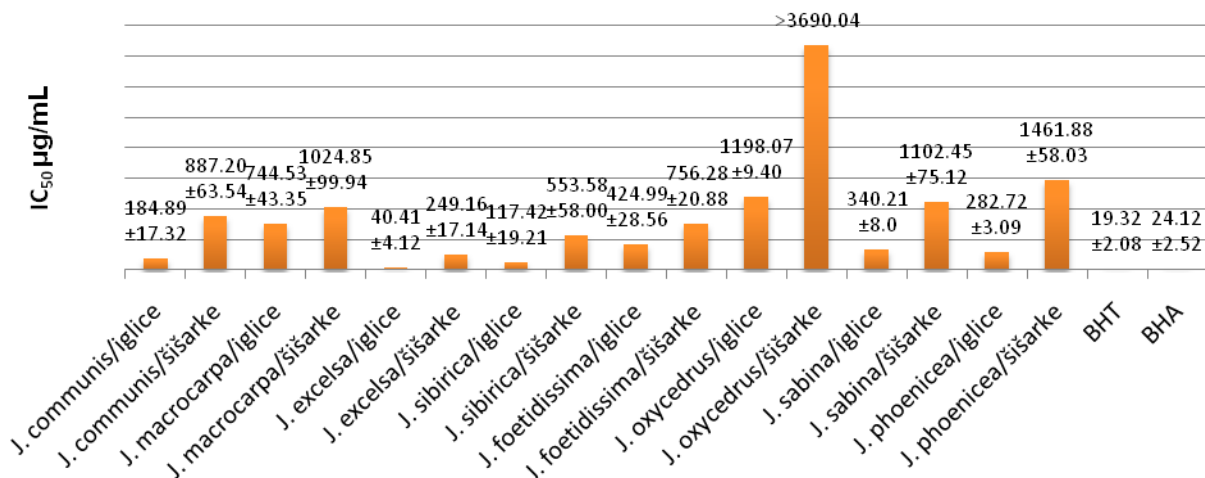
Kapacitet „hvatanja“ NO^{\cdot} radikala ispitanih ekstrakata vrsta roda *Juniperus* prikazan je na *Histogramu 4.5.*



Histogram 4.5. Potencijal neutralizacije NO[•] radikala ekstrakata iglica i šišarki vrste roda *Juniperus*

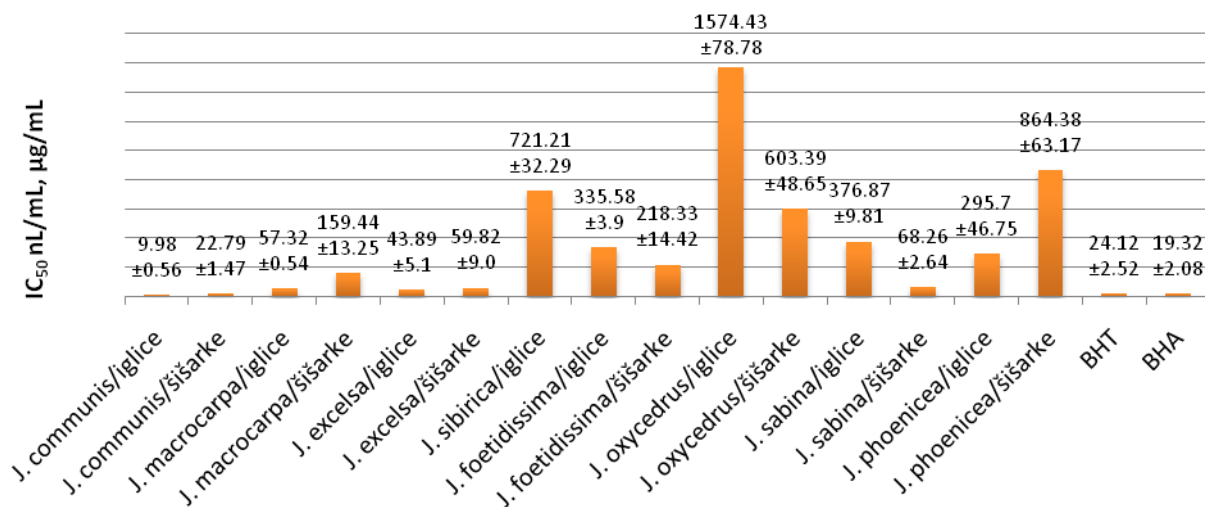
Kao i pri neutralizaciji O₂^{•-} radikala i pri neutralizaciji NO[•] radikala, ni standardni antioksidanti BHA i BHT (radna koncentracija od 0.1 do 3.0 mg/mL) ni etarska ulja (radna koncentracija od 1.25 do 60.0 μL/mL) nisu pokazali koncentraciono zavisnu aktivnost. Ekstrakti su pokazali znatan potencijal postižući IC₅₀ vrednosti u rasponu od 0.15 (*J. sibirica*/iglice) do 0.84 mg/mL (*J. macrocarpa*/iglice), dok samo dva ekstrakta (*J. oxycedrus*/šišarke i *J. phoenicea*/šišarke) nisu postigla IC₅₀ vrednost pri ispitivanom opsegu koncentracija. Od osam vrsta, kod četiri statistički značajno (p<0.05) bolju aktivnost u pogledu neutralizacije NO[•] radikala ispoljavaju ekstrakti iglica u poređenju sa ekstraktima šišarki.

Potencijal ispitivanih ekstrakata i etarskih ulja da inhibiraju lipidnu peroksidaciju prikazan je na *Histogramu 4.6. i 4.7.*



Histogram 4.6. Potencijal inhibicije lipidne peroksidacije ekstrakata iglica i šišarki vrste roda *Juniperus*

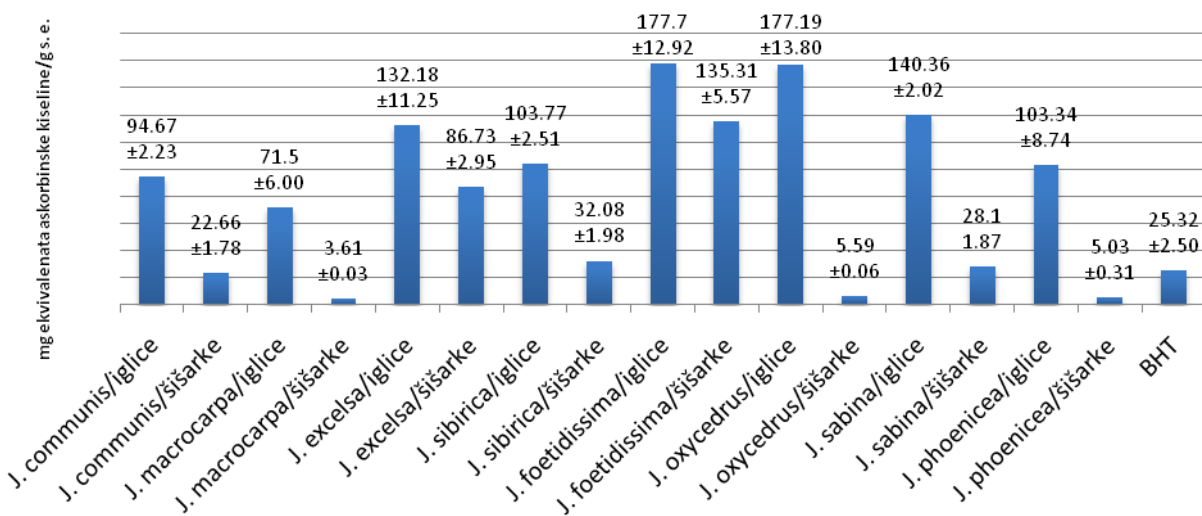
Nijedan od ekstrakata šišarki i iglica ispitivanih vrsta *Juniperus* nije pokazao bolju aktivnost pri inhibiciji lipidne peroksidacije od standardnih antioksidanata BHT i BHA. Određene IC₅₀ vrednosti iznose od 40.41 (*J. excelsa*/iglice) do 1461.88 µg/mL (*J. phoenicea*/šišarke), dok ekstrakt *J. oxycedrus*/šišarke nije dostigao IC₅₀ vrednost u ispitivanom opsegu koncentracija. Kod svih ispitivanih vrsta iglice su pokazale statistički značajno bolju aktivnost (p<0.05) pri inhibiciji lipidne peroksidacije u poređenju sa odgovarajućim šišarkama.



Histogram 4.7. Potencijal inhibicije lipidne peroksidacije etarskih ulja iglica i šišarki vrste roda *Juniperus*

Od svih ispitivanih etarskih ulja, jedino su etarska ulja iglica i šišarki vrste *J. communis* pokazala bolju sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije u poređenju sa standardnim antioksidantom BHT, dok je od BHA aktivnije bilo samo etarsko ulje iglica *J. communis*. Određene IC₅₀ vrednosti su u opsegu od 9.98 nL/mL (*J. communis*/iglice) do 1574.43 nL/mL (*J. oxycedrus*/iglice). Kad se porede aktivnosti etarskih ulja iglica i šišarki iste vrste, ne može se uočiti zakonitost budući da kod tri vrste od sedam, veću aktivnost imaju šišarke, a kod četiri vrste etarsko ulje iglica. U poređenju sa odgovarajućim ekstraktom, deset od ukupno petnaest etarskih ulja je statistički značajno aktivnije ($p < 0.05$) u pogledu inhibicije lipidne peroksidacije.

Rezultati redukcionog potencijala ispitivanih ekstrakata vrste roda *Juniperus*, određenih FRAP testom i izraženim u mg ekvivalenata askorbinske kiseline/g suvog ekstrakta, prikazani su na *Histogramu 4.8*.

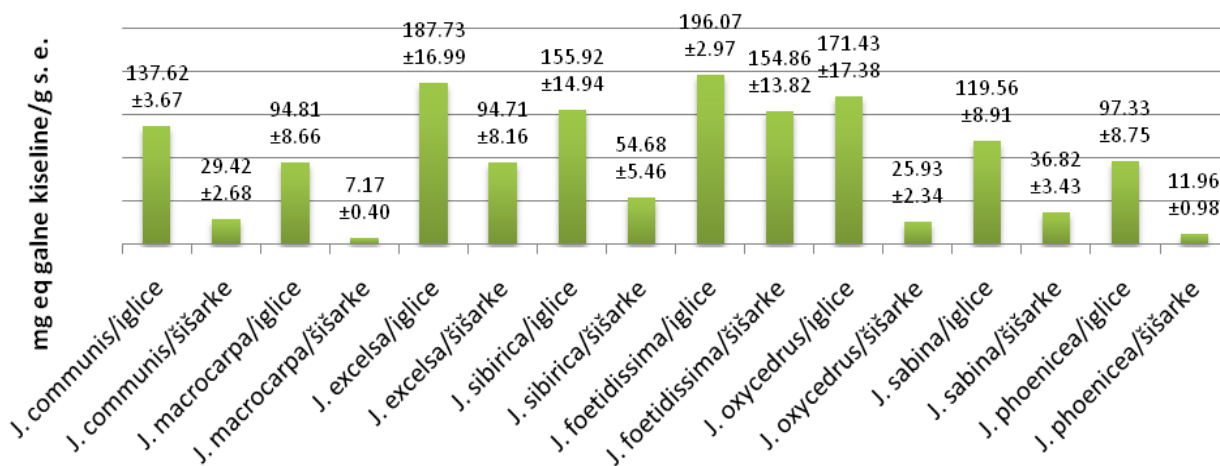


Histogram 4.8. Redukcioni potencijal ispitanih ekstrakata iglica i šišarki vrsta *Juniperus* izražen u mg ekvivalenata askorbinske kiseline/g suvog ekstrakta

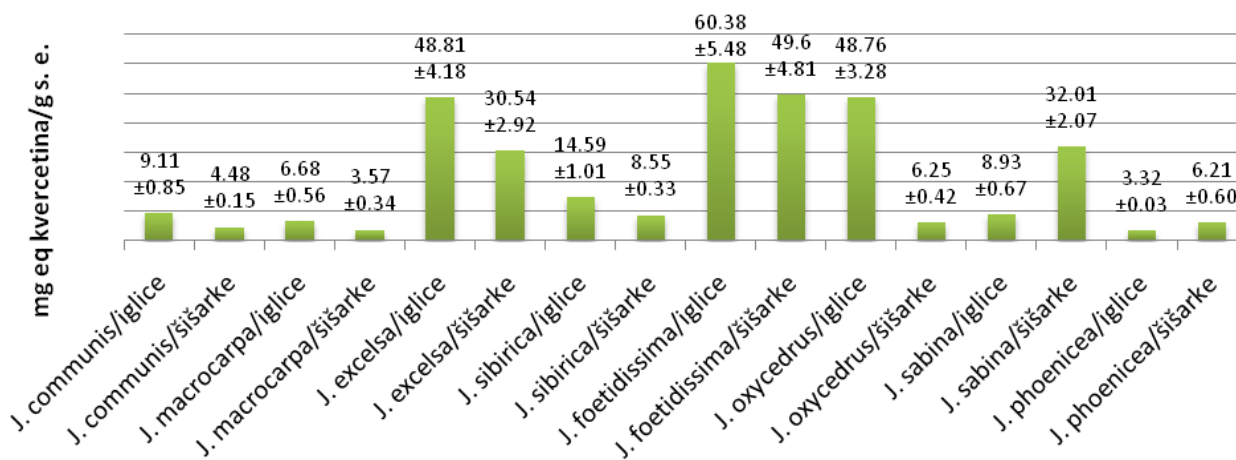
U poređenju sa redukcionim potencijalom standardnog antioksidanta BHT (25.32 mg ekv. askorbinske kis/g), 12 od ukupno 16 ekstrakata pokazalo je od neznatno do sedam puta veći redukcioni potencijal. Najveći redukcioni potencijal pokazao je metanolni ekstrakt iglica vrste *J. foetidissima* (177.7 mg ekv. askorbinske kis/g s. e.), dok je najmanji pokazao ekstrakt šišarki vrste *J. macrocarpa* (3.61 mg ekv. askorbinske kis/g s. e.). Kod svih ispitivanih vrsta

roda *Juniperus*, ekstrakt iglica pokazao je statistički značajno bolji redukcionni potencijal ($p < 0.05$) od ekstrakta šišarki.

Pošto se smatra da je antioksidantna aktivnost biljnih ekstrakata u velikoj meri zavisna od ukupnog sadržaja fenolnih i flavonoidnih komponenti, prirodnih proizvoda sa velikim antioksidantnim potencijalom, određen je njihov ukupni sadržaj i rezultati su prikazani na *Histogramima 4.9. i 4.10.*



Histogram 4.9. Sadržaj ukupnih fenola u ispitivanim ekstraktima iglica i šišarki vrste *Juniperus* izražen u mg ekv. galne kiseline/g suvog ekstrakta



Histogram 4.10. Sadržaj ukupnih flavonoida u ispitivanim ekstraktima iglica i šišarki vrste *Juniperus* izražen u mg ekv. kvercetina/g suvog ekstrakta

Najveći sadržaj ukupnih fenola utvrđen je u ekstraktu *J. foetidissima/iglice* (196.07 mg ekv. galne kiseline/g s. e.), a najmanji u ekstraktu *J. macrocarpa/šišarke* (7.17 mg ekv. galne

kiseline/g s. e.). Sedam ekstrakata iglica pokazalo je statistički značajno ($p < 0.05$) veći sadržaj ukupnih flavonoida u poređenju sa ekstraktom šišarki iste vrste, dok je samo kod oba ekstrakta *J. foetidissima* ovaj sadržaj bio sličan. Najveći sadržaj flavonoida (60.38 mg ekv. kvercetina/g s. e.) takođe je određen u ekstraktu *J. foetidissima*/iglice, a najmanji (3.32 mg ekv. kvercetina/g s. e.) u ekstraktu *J. phoenicea*/šišarke. Kad se poredi ukupan sadržaj flavonoidnih komponenti između ekstrakta iglica i šišarki, kod šest vrsta od ispitivanih osam, veći sadržaj imaju iglice, sa jasno izraženim razlikama kod pet vrsta (*J. communis*, *J. macrocarpa*, *J. excelsa*, *J. sibirica* i *J. oxycedrus*).

Uzimajući u obzir dobijene rezultate, primenom regresione analize izračunati su korelacioni faktori između ukupnog sadržaja fenola, odnosno flavonoida i antioksidantnih aktivnosti, izraženih kao recipročne vrednosti izračunatih IC_{50} , osim u slučaju redoks potencijala gde su korišćene direktne vrednosti (Tabela 4.1.).

Tabela 4.1. Korelacioni faktor (R^2) između ukupnog sadržaja fenola i flavonoida i antioksidantne aktivnosti

	Korelacioni faktor (R^2)					
	Kapacitet „hvatanja“ radikala				Lipidna peroksidacija	Redukcioni potencijal
	DPPH [•]	HO [•]	O ₂ ^{•-}	NO [•]		
Ukupni fenoli	0.9278	0.6127	0.9004	0.7017	0.4540	0.9663
Ukupni flavonoidi	0.7343	0.5011	0.6639	0.4472	0.3316	0.7780

Regresiona analiza, primenjena na dobijene rezultate antioksidantne aktivnosti ekstrakata vrste roda *Juniperus* pokazuje da postoji visok stepen korelacije sadržaja ukupni fenola i sposobnosti „hvatanja“ DPPH[•] i O₂^{•-} radikala, kao i redukcionog potencijala ($R^2 = 0.9278$, 0.9004 i 0.9663), što ukazuje na to da pri neutralizaciji slobodnih radikalskih vrsta, kada se ona odvija po mehanizmu transfera elektrona tj. redukcije, fenolna jedinjenja imaju ključnu ulogu. Manje vrednosti ovih faktora ($R^2 = 0.7343$, 0.6639 i 0.7917) utvrđene su između sadržaja ukupnih flavonoida u ekstraktima i navedenih antioksidantnih aktivnosti, što ukazuje da sadržaj flavonoida utiče na nivo slobodnoradikalske neutralizacije (redukcije), ali da nije u direktnoj korelaciji. U pogledu sposobnosti „hvatanja“ HO[•] i NO[•] radikala, utvrđena je umerena korelacija sa sadržajem ukupnih fenola ($R^2 = 0.6127$ i 0.7017), dok je korelacija sa sadržajem ukupnih flavonoida niska ($R^2 = 0.5011$ i 0.4472). Dobijeni korelacioni faktori ukazuju na značajnu aktivnost fenola u ovim procesima, ali i pokazuju da flavonoidni

metaboliti nemaju velikog uticaja na neutralizaciju pomenutih radikalskih vrsta, što može biti posledica aktivnosti drugih klasa jedinjenja prisutnih u ovim vrstama, kao i osetljivosti same metode (uticaj svetlosti, temperature). Takođe, nizak stepen korelacije utvrđen je između sadržaja ukupnih fenola i flavonoida i potencijala lipidne peroksidacije ($R^2 = 0.4540$ i 0.3316). Pored već navedenog uticaja drugih klasa jedinjenja, i sama metoda koja se primenjuje za određivanje inhibicije lipidne peroksidacije ima nekoliko nedostataka koji mogu uticati na stepen korelacije. Naime, prisustvo Fe-helatacionih agenasa u ekstraktima može da utiče na Fentonovu reakciju, a TBA metoda korišćena za detekciju MDA, jednog od krajnjih proizvoda lipidne peroksidacije, nije specifična ni dovoljno osetljiva za ovaj proizvod, jer i druga, strukturno slična jedinjenja, uglavnom dialdehidi i ugljeni hidrati, čije prisustvo je često u biljnim vrstama, takođe mogu da reaguju sa TBA.

Ispitivanje antioksidantnog potencijala vrsta roda *Juniperus* bilo je predmet istraživanja mnogih studija čiji su podaci iz literature navedeni u *Tabeli 2.4*, a za samo jednu (*J. macrocarpa*) od osam ispitivanih vrsta ne postoje nikakvi navodi o antioksidantnom potencijalu. Postojeće podatke iz literature i rezultate dobijene u prikazanim ispitivanjima teško je porediti zbog različitih eksperimentalnih uslova. Međutim, u našim ispitivanjima, primenom šest testova koji se zasnivaju na različitim principima određivanja antioksidantnog potencijala i određivanjem ukupnog sadržaja flavonoidnih i fenolnih komponenti za šesnaest ekstrakata, pri istim eksperimentalnim uslovima dobijeni su rezultati koji se mogu lako uporediti i na osnovu njih može se odrediti najpotentniji ekstrakt. Analizom dobijenih rezultata, uočava se da ekstrakti iglica imaju značajno bolju aktivnost od odgovarajućih ekstrakata šišarki, budući da u većini testova ekstrakt iglica pokazuje statistički bolju aktivnost od šišarki. U cilju određivanja najpotentnije vrste kleke između osam ispitivanih iz roda *Juniperus*, izvršeno je rangiranje gde je korišćen relativni odnos IC_{50} vrednosti ispitivanih ekstrakata i utvrđen je sledeći odnos ukupne antioksidantne aktivnosti vrsta, od najpotentnije: *J. foetidissima* > *J. excelsa* > *J. sibirica* > *J. sabina* > *J. communis* > *J. oxycedrus* > *J. macrocarpa* > *J. phoenicea*. U većini primenjenih testova, najpotentniji ekstrakti bili su najviše deset puta jači antioksidantni agensi od najmanje aktivnog ekstrakta, što ukazuje na očiglednu razliku u antioksidantnom potencijalu različitih vrsta. Upoređujući rezultate antioksidantnog potencijala ispitivanih ekstrakata sa potencijalom poznatih antioksidantnih standarda BHA i BHT, ekstrakti nisu pokazali značajnu aktivnost.

O antioksidantnom potencijalu etarskih ulja iglica i šišarki ispitivanih vrsta roda *Juniperus* ima svega nekoliko navoda u literaturi, što ukazuje na to da su ovde predstavljeni rezultati prvi koji ukazuju na nivo antioksidantnog potencijala etarskih ulja kleke. U većini primenjenih testova, nije bilo moguće odrediti antioksidantni potencijal etarskih ulja zbog njihove nepolarne prirode koja smanjuje rastvotljivost u puferskim sistemima. Međutim, bilo je moguće odrediti potencijal „hvatanja“ DPPH radikala i stepena inhibicije lipidne peroksidacije. Rezultati su pokazali da su etarska ulja iglica aktivnija od etarskih ulja odgavarajućih šišarki iste vrste. Takođe, relativnim poređenjem rezultata antioksidantne aktivnosti dobija se sledeći niz koji pokazuje antioksidantnu aktivnost etarskih ulja ispitivanih vrsta kleke, od najpotentnije: *J. communis* > *J. excelsa* > *J. macrocarpa* > *J. oxycedrus* > *J. foetidissima* > *J. sabina* > *J. phoenicea*. Etarsko ulje šišarki *J. sibirica* nije bilo korišćeno u testovima antioksidantne aktivnosti zbog male količine koja je dobijena u procesu izolacije, tako da nije ni uvršćeno u opšte rangiranje, ali je etarsko ulje iglica imalo srednju aktivnost u poređenu sa ostalim etarskim uljima.

Evaluacija bioloških aktivnosti etarskih ulja je komplikovana zbog njihovog veoma kompleksnog i raznolikog sastava. Generalno, terpenke komponente koje poseduju dvostruke veze i hidroksilne grupe u svojoj strukturi imaju sposobnost za neutralizaciju slobodnih radikala. Poznato je da najviši antioksidantni potencijal imaju oksidovani monoterpeni, timol i karvakrol, i monoterpenki ugljovodonici, terpinolen, α - i γ -terpinen i sabinen (Ruberto i Baratta, 2000; Bozin i sar., 2007). Kako je sabinen prisutan u najvećem broju ispitivanih etarskih ulja, primenjena je regresiona analiza procenta sabinena u ispitivanim etarskim uljima i recipročne IC_{50} vrednosti dobijene pri DPPH testu i određivanju potencijala lipidne peroksidacije. Korelacioni faktor dobijen pri regresionoj analizi je mali ($R^2 = 0.4540$ i 0.3316 , redom) i ne pokazuje nikakvu zavisnost između količine sabinena i antioksidantne aktivnosti, što nije neuobičajno, budući da terpenke komponente prisutne u etarskim uljima mogu da deluju sinergistički i samim tim da pokazuju bolju biološku aktivnost nego pojedinačne, izolovane komponente.

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja antioksidantne aktivnosti vrsta *Juniperus*, ne može da se izvede zaključak o tome da li ekstrakti ili etarska ulja pokazuju bolji opšti antioksidantni potencijal. Naime, u DPPH testu, etarska ulja bila su neuporedivo lošija, ali su znatno bolju aktivnost pokazala pri inhibiciji lipidne peroksidacije. Jasno izražena razlika u

aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata je najverovatnije posledica različite polarnosti njihovih komponenata, što je ograničilo mogućnosti ispitivanja antioksidantnog potencijala pri različitim eksperimentalnim uslovima (različito polarnim reakcionim sistemima), tako da se dobijeni rezultati ne mogu sa sigurnošću koristiti za opšte poređenje ukupne antioksidantne aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata.

Uopšteno, podataka o antioksidantnom potencijalu ekstrakata iglica i šišarki vrsta roda *Juniperus* ima dosta, dok za etarska ulja postoji samo nekoliko. Dobijeni rezultati pokazuju da su sve ispitane vrste potentni antioksidantni agensi, odnosno da mogu da utiču na sprečavanje slobodnoradikalnih procesa zasnovanih na transferu elektrona, neutralizaciji slobodnoradikalnih vrsta ili da inhibiraju lipidnu peroksidaciju. Po visokom stepenu antioksidantnog potencijala izdvajaju se vrste *J. foetidissima* i *J. excelsa*, dok su najčešće primenjivane vrste u tradicionalnoj medicini i kulinarstvu *J. communis* i *J. oxycedrus*, pokazale iznenađujuće lošiju aktivnost. Predstavljeni rezultati ukazuju na to da postoji izvestan stepen korelacije između sadržaja fenola, odnosno flavonoida u ispitanim ekstraktima i navedenih antioksidantnih aktivnosti i da je antioksidantni potencijal etarskih ulja najverovatnije posledica sinergističkog delovanja njegovih komponenti. Takođe, dobijeni rezultati potvrđuju da su ispitane vrste roda *Juniperus* potencijalni izvor prirodnih proizvoda, fenolnih i terpenoidnih, koji mogu biti potentni antioksidantni agensi.

4.3. Antiinflamatorni potencijal

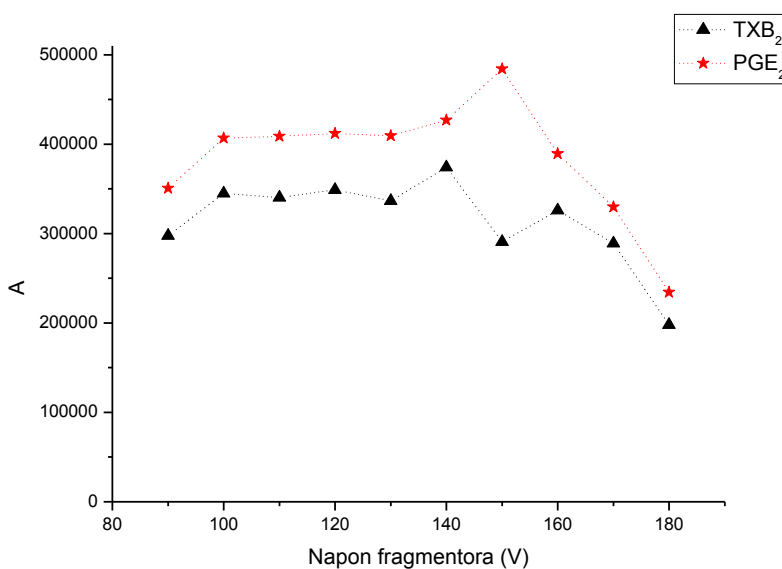
4.3.1. Optimizacija LC-MS/MS parametara za praćenje PGE₂ i TXB₂

U cilju određivanja antiinflamatornog potencijala ekstrakata i etarskih ulja iglica i šišarki vrsta roda *Juniperus* primenjena je modifikovana metoda, čija optimizacija i validacija su detaljno opisane u doktorskoj disertaciji docenta dr Ivane Beare (2010). U pomenutoj metodi, visoko osetljiva i specifična LC-MS/MS tehnika primenjena je u cilju praćenja nivoa produkcije dva medijatora inflamacije 12-HHT i 12-HETE, kao pokazatelja aktivnosti dva enzima metabolizma arahidonske kiseline COX-1 i 12-LOX u humanim trombocitima. U okviru ove doktorske disertacije, postojeća metoda proširena je na praćenje još dva medijatora inflamacija: TXB₂ i PGE₂.

Eksperimentalni uslovi, koji su korišćeni pri određivanju antiinflamatornog potencijala, opisani su u *Poglavlju 3.5*. Svi eksperimentalni uslovi su isti kao i kod metode opisane u doktorskoj disertaciji docenta dr Ivane Beare (2010), sem optimizovanih uslova za detekciju TXB₂ i PGE₂ pomoću LC-MS/MS tehnike, koji su opisani u ovom radu.

TXB₂ i PGE₂ su kvantifikovana u MRM modu, koji je idealan za kvantitaciju, jer će signal dati samo jedinjenja željene molekulske mase, koja fragmentacijom daju proizvode definisane molekulske mase, čime se postiže visoka selektivnost i vrlo nizak šum. MRM mod podrazumeva izolaciju željenog prekursora na prvom kvadrupolu (Q1), kolizijom indukovanu disocijaciju (CID) u kolizionoj ćeliji (Q2) i izolaciju željenog produkta na trećem kvadrupolu (Q3) QqQ MS-MS instrumenta. Definisanje odgovarajuće MRM metode obuhvatalo je optimizaciju napona fragmentora, izbor fragmenata i optimizaciju CID.

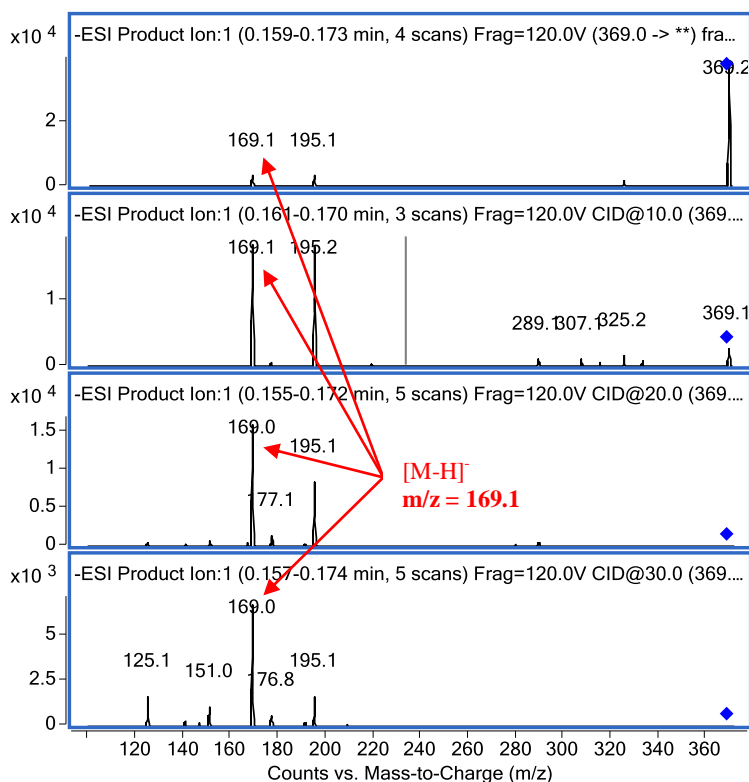
Optimizacija napona fragmentora podrazumevala je takav izbor napona fragmentora (napon između kapilare i skimera), koji obezbeđuje potpunu desolvataciju jona, a ne rezultira fragmentacijom [M-H]⁺. Miks standarda TXB₂ i PGE₂ analiziran je u MS2SIM modu (praćeni su samo [M-H]⁺ joni) uz napone od 90-180 V (uz inkremente od 10 V) i određene su površine pikova TXB₂ i PGE₂. Zavisnost površine (A) od napona prikazana je na *Slici 4.1*.



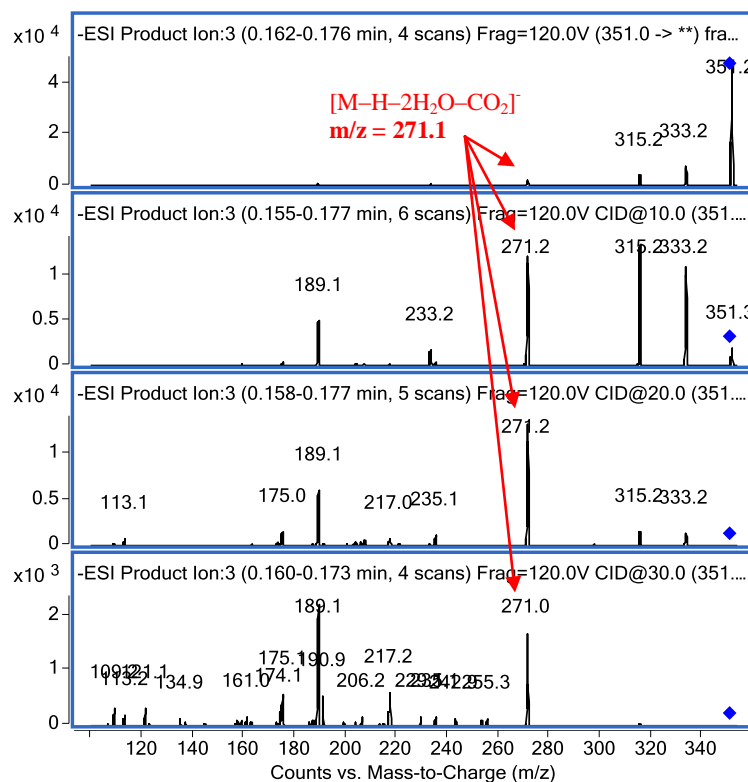
Slika 4.1. Optimizacija napona fragmentora

Kao optimalna vrednost zadržan je napon od 120 V, korišćen i za određivanje PGB₂, 12-HETE i 12-HHT, koji daje neznatno slabiji signal nego na 150 V, ali stabilan u širom naponskom opsegu.

Izbor fragmenata obuhvatao je snimanje miksa standarda TXB₂ i PGE₂ u *Product Ion Scan* modu, koji podrazumeva izolaciju željenog prekursora na Q1, kolizijom indukovanu disocijaciju u Q2 i skeniranje nastalih fragmenata na Q3. Korišćene su kolizionne energije 0, 10, 20 i 30 V. Dobijeni spektri prikazani su na *Slikama 4.2. i 4.3.*



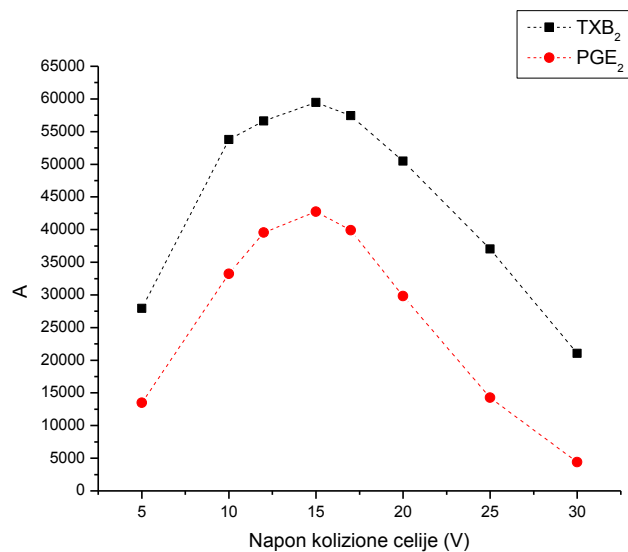
Slika 4.2. CID spektri $[M-H]^-$ jona TXB₂ pri kolizionim energijama 0, 10, 20 i 30 V



Slika 4.3. CID spektri $[M-H-2H_2O-CO_2]^-$ jona PGE_2 pri kolizionim energijama od 0, 10, 20, 30 V

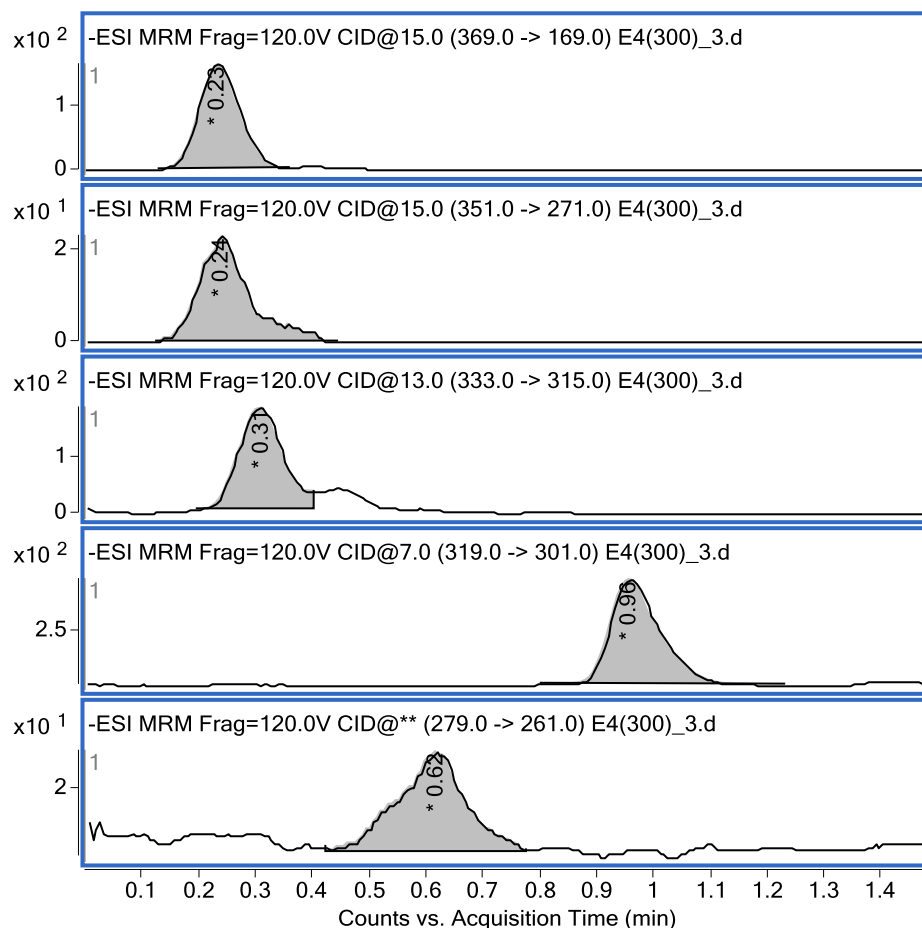
Iz spektara se vidi da je fragmentacija TXB_2 jednostavna, sa samo dva intenzivna jona-produkta, $m/z = 195$ i 169 . Kao jon za kvantitaciju odabran je produkt $m/z = 169$, koji daje znatno intenzivniji signal (Slika 4.2.). Spektar PGE_2 je složeniji, sa 4 intenzivna fragmenta i nizom minornih. Dva intenzivna fragmenta sa visokim m/z (333 i 315) odbačena su, jer potiču od gubitka jednog i dva molekula vode iz jona prekursora, što je reakcija niske specifičnosti. Kao target jon odabran je jon $m/z = 271$ $[M-H-2H_2O-CO_2]^-$, koji daje intenzivniji signal od alternativnog jona $m/z = 189$ (Slika 4.3.).

Optimizacija kolizijom indukovane disocijacije (collision induced dissociation, CID) obuhvatala je definisanje takvog napona kolizione ćelije, koji obezbeđuje maksimalan prinos target jona. Miks standarda TXB_2 i PGE_2 analiziran je u MRM modu, pri čemu je napon variran u opsegu 5–30 V u inkrementima od 5 V (2 V u okolini maksimuma signala). Optimalan napon (15 V za oba jedinjenja) određen je grafički, kao vrednost koja daje najveći odziv (površinu pika, A) - Slika 4.4.



Slika 4.4. Optimizacija napona kolizione ćelije

Tipičan hromatogram radne probe, koja sadrži četiri praćena metabolita metabolizma arahidonske kiseline (TXB₂, PGE₂, 12-HHT i 12-HETE) i interni standard PGB₂, predstavljen je na *Slici 4.5*.



Slika 4.5. Hromatogram radne probe sa ekstraktom koncentracije 300 mg/mL; retenciono vreme: 0.23 TXB₂, 0.24 PGE₂, 0.31 min PGB₂, 0.62 min 12-HHT, 0.96 min 12-HETE

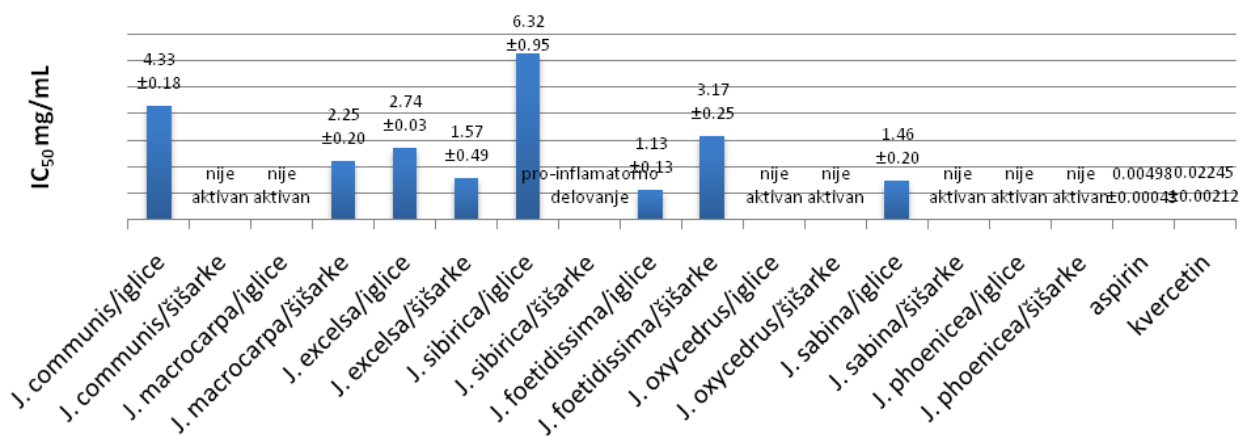
Kao poslednji korak evaluacije performansi metode, određeno je nekoliko parametara. Standardne kalibracione krive (*standard calibration curves*, SC) u metanolu i kalibracione krive matriksa (*matrix-matched calibration curve*, MMC) u kojima je neaktiviranim trombocitima (matriks) dodat rastvor standarda, urađene su u rasponu koncentracija 28.1–1125.0 ng/mL (TXB₂) i 4.50–180.0 ng/mL (PGE₂). Linearna regresija bez težinskih koeficijenata je odabrana za sve $A/A_{\text{intst}} = f(C_{\text{anal}})$ krive, jer obezbeđuje najbolju distribuciju grešaka na krivi reziduala. Regresione jednačine i korelacioni faktori bili su sledeći: za TXB₂/SC $y = 0.01170x - 0.17220$ ($R^2 = 0.995$), za TXB₂/MMC $y = 0.00593x - 0.04310$ ($R^2 = 0.995$), za PGE₂/SC $y = 0.00310x - 0.00892$ ($R^2 = 0.997$) i za PGE₂/MMC $y = 0.00184x - 0.00323$ ($R^2 = 0.996$). Uticaj matriksa izračunat je kao odnos smanjenje/povećanje signala (*signal suppression/enhancement*, SSE), odnosno odnos nagiba MMC i SC i iznosio je 51% za TXB₂ i 168% za PGE₂. Pošto nije bilo moguće odrediti odnos signal-šum (zbog odsustva

šuma bazne linije), za limit kvantitacije (*limit of quantitation*, LoQ) uzeta je koncentracija najrazblaženijeg standarda za koga je vizuelno ocenjeno da se površina može pouzdano odrediti, što je iznosilo 28 ng/mL za TXB₂ i 45 ng/mL za PGE₂, odnosno 0.22 i 0.14 ng standarda injektovanih na kolonu. Preciznost metode izračunata je kao srednja vrednost varijanse IC₅₀ vrednosti dobijenih pri analizi aktivnosti šesnaest ekstrakata i petnaest etarskih ulja kleke (za svaki uzorak konstruisane su tri krive sa šest tačaka i određene su IC₅₀ vrednosti) i iznosi 1.4% za TXB₂ i 1.59% za PGE₂.

4.3.2. Određivanje antiinflamatornog potencijala

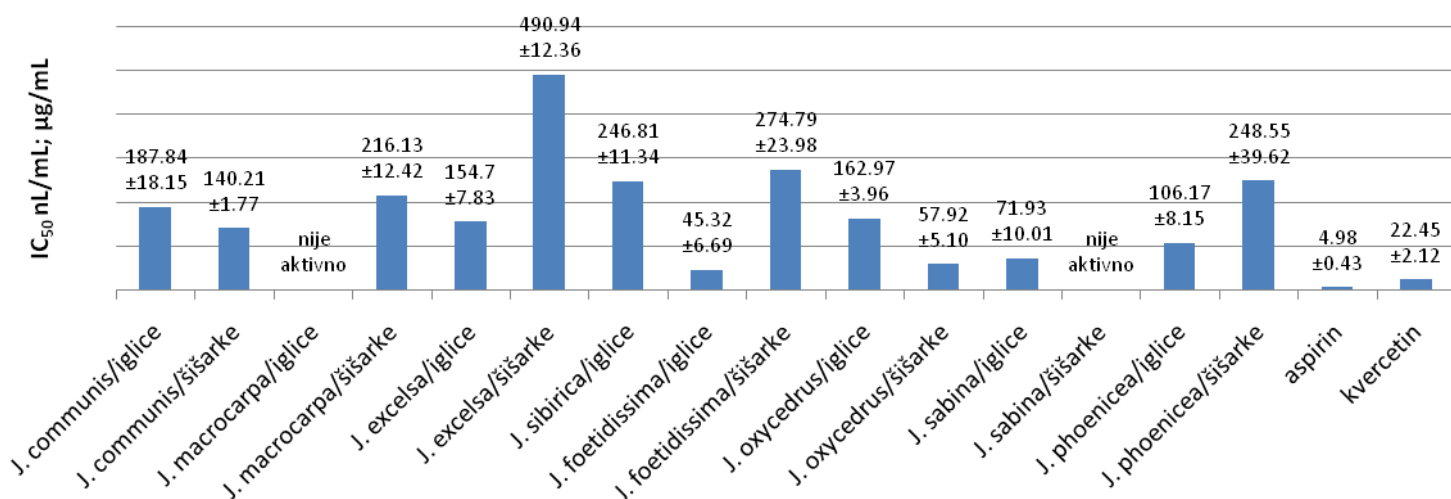
U cilju određivanja antiinflamatornog potencijala ekstrakata i etarskih ulja iglica i šišarki osam vrsta roda *Juniperus* i standardnih jedinjenja aspirina (acetilsalicilna kiselina) i kvercetina, primenjena je modifikovana, prethodno opisana (Beara, 2010) *ex vivo* metoda, zasnovana na praćenju potencijala inhibicije enzima ciklooksigenaznog (COX-1) i lipooksigenaznog (12-LOX) puta metabolizma arahidonske kiseline. Kao intaktni ćelijski sistem, odnosno izvor COX-1 i 12-LOX enzima, korišćen je preparat humanih trombocita, inflamacija je izazivana sukcesivnim dodatkom dvovalentne kalcijumove jonofore A23184 (kalcimicin) i kalcijum-hlorida, a produkcija metabolita praćena je primenom LC-MS/MS tehnike. Antiinflamatorna aktivnost ekstrakata i etarskih ulja određena je u smislu potencijala inhibicije produkcije tri proizvoda ciklooksigenaznog puta (12-HHT, TXB₂ i PGE₂) i jednog proizvoda lipooksigenaznog puta (12-HETE) metabolizma arahidonske kiseline. Stepen inhibicije određen je na osnovu odnosa površine pikova metabolita i internog standarda, a rezultati su prikazani u *Poglavlju 8.3. (Tabele 8.48.-8.78.)*. Standardi i većina ekstrakata i etarskih ulja iglica i šišarki pokazali su koncentraciono zavisni stepen inhibicije produkcije četiri metabolita koji su praćeni, a odgovarajući grafici prikazani su u *Poglavlju 8.3. (Grafici 8.43.-8.73.)*.

IC₅₀ vrednosti inhibicije produkcije 12-HHT koje su postignute pri dejstvu ispitanih ekstrakata, etarskih ulja i standardnih inhibitora prikazane su na *Histogramima 4.11. i 4.12.*



Histogram 4.11. Potencijal inhibicije produkcije 12-HHT metabolita standarda i ekstraktata iglica i šišarki i vrste roda *Juniperus*

Metanolni ekstrakti iglica i šišarki ispitivanih vrsta roda *Juniperus* pokazali su slab potencijal inhibicije produkcije 12-HHT metabolita, sa određenim IC₅₀ vrednostima od 1.13 do 6.32 mg/mL, gde je ekstrakt *J. foetidissima*/iglice pokazao najbolju, a ekstrakt *J. sibirica*/iglice najlošiju aktivnost. Od ispitivanih šesnaest, za osam ekstrakata nije određena IC₅₀ vrednost pri ispitivanim koncentracijama, niti su ekstrakti pokazali koncentracionu zavisnost, osim ekstrakta *J. sibirica*/šišarke, koji ispoljava koncentracionu zavisnost i pro-inflamatorno dejstvo pri manjim koncentracijama (Grafik 8.44.).

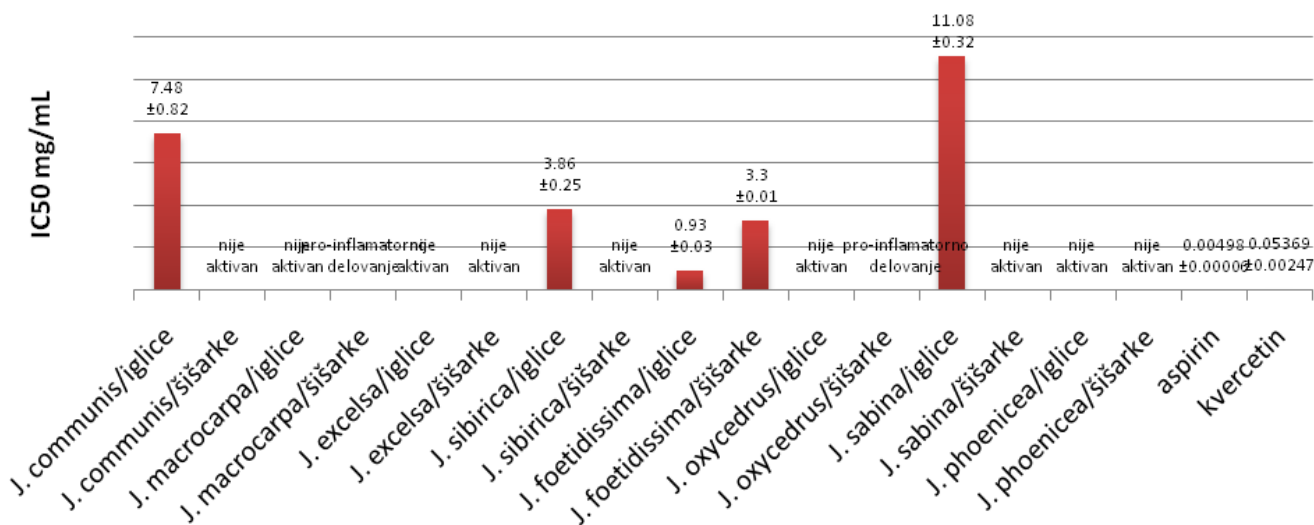


Histogram 4.12. Potencijal inhibicije produkcije 12-HHT metabolita standarda i etarskih ulja iglica i šišarki i vrste roda *Juniperus*

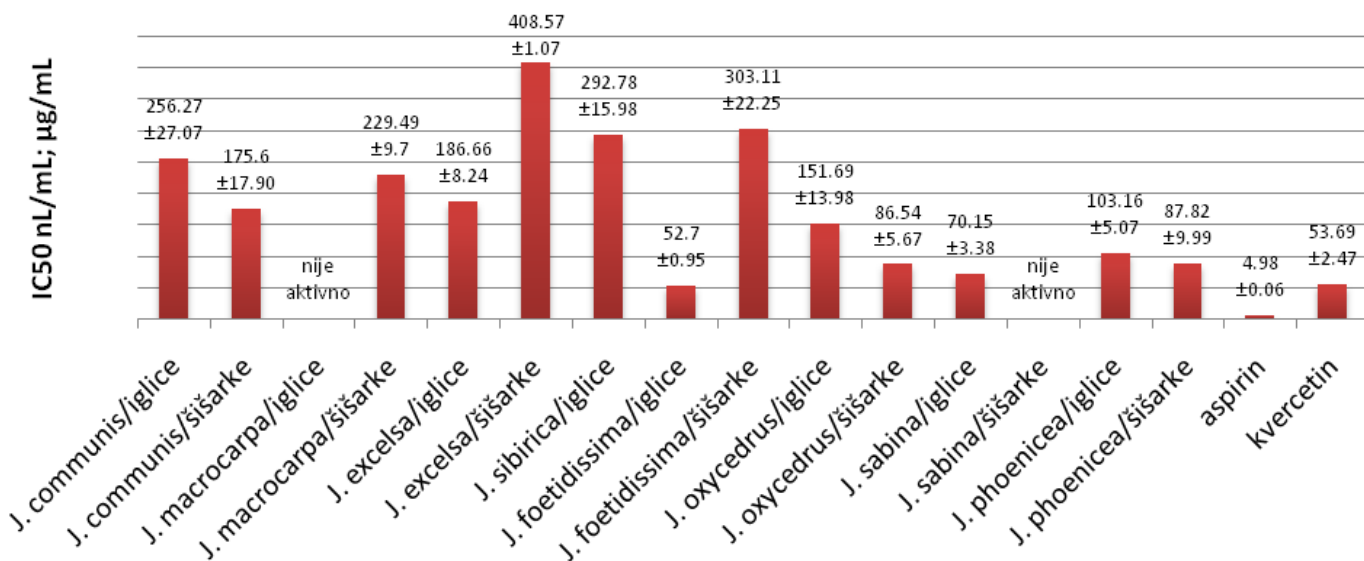
Za ispitivana etarska ulja vrsta roda *Juniperus*, 50% inhibicije produkcije 12-HHT metabolita postignuto je pri koncentracijama od 45.32 (*J. foetidissima*/iglice) do 490.94 nL/mL (*J. excelsa*/šišarke), a samo dva etarska ulja nisu postigla IC₅₀ vrednost, niti su pokazala doznu zavisnost u ispitivanom opsegu koncentracija (*J. macrocarpa*/iglice i *J. sabina*/šišarke).

Pri poređenju rezultata aktivnosti ispitivanih ekstrakata i standarda sa etarskim uljima, važno je imati u vidu da masena koncentracija ekstrakata i standarda izražena u mg/mL ili µg/mL odgovara zapreminskoj koncentraciji etarskog ulja izraženoj u µL/mL, odnosno nL/mL. Tako da, pri poređenju IC₅₀ vrednosti ekstrakata i etarskih ulja sa standardnim jedinjenjima aspirinom (IC₅₀ = 0.00498 mg/mL) i kvercetinom (IC₅₀ = 0.02245 mg/mL), može da se zaključi da etarska ulja pokazuju izuzetan inhibitorski potencijal pri produkciji medijatora inflamacije 12-HHT, s obzirom na to da su aktivnosti etarskih ulja i standarda istog reda veličine. Sa druge strane, ekstrakti su pokazali znatno slabiji potencijal inhibicije produkcije ovog metabolita.

Na *Histogramima 4.13. i 4.14.* prikazane su IC₅₀ vrednosti inhibicije produkcije TXB₂ metabolita za ispitivane ekstrakte, etarska ulja i standardne supstance.



Histogram 4.13. Potencijal inhibicije produkcije TXB₂ metabolita standarda i ekstrakata iglica i šišarki i vrste roda *Juniperus*



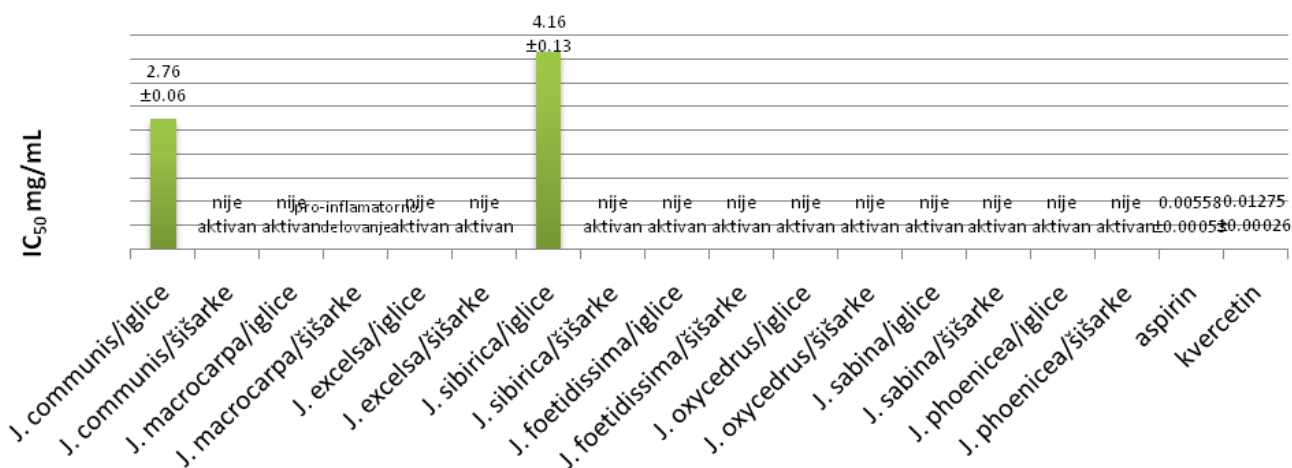
Histogram 4.14. Potencijal inhibicije produkcije TXB₂ metabolita standarda i etarskih ulja iglica i šišarki i vrste roda *Juniperus*

Pri inhibiciji produkcije TXB₂ metabolita, IC₅₀ vrednosti postignute su za samo 5 ekstrakata, a iznosile su od 0.93 (*J. foetidissima*/iglice) do 11.08 mg/mL (*J. sabina*/iglice). Ovakav rezultat ukazuje na slab potencijal ekstrakata kleke da inhibiraju sintezu TXB₂. Ekstrakt šišarki vrste *J. oxycedrus* pokazuje koncentracionu zavisnost pri inhibiciji produkcije TXB₂, ali ima pro-inflamatorno dejstvo, budući da se sa povećanjem koncentracije ekstrakta, povećava i koncentracija TXB₂ u trombocitima (Grafik 8.52.). Ekstrakt šišarki *J. macrocarpa* pokazuje koncentracionu zavisnost u odnosu na stepen produkcije TXB₂, s tim da pri manjim koncentracijama ima pro-inflamatorno dejstvo, a sa povećanjem koncentracije ekstrakta, produkcija TXB₂ se smanjuje, ali bez postizanja IC₅₀ vrednosti u ispitivanom opsegu koncentracija (Grafik 8.51.).

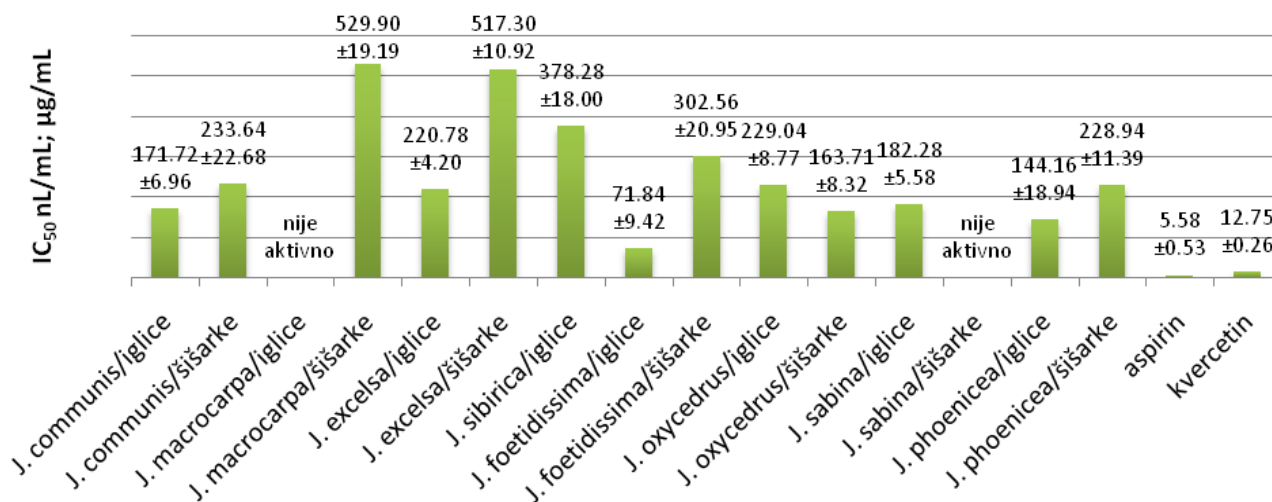
Etarska ulja pokazala su bolji potencijal inhibicije produkcije TXB₂ metabolita, u odnosu na ekstrakte. Određena IC₅₀ iznosila je od 52.7 (*J. foetidissima*/iglice) do 408.58 nL/mL (*J. excelsa*/šišarke) i nije postignuta pri dejstvu samo dva etarska ulja (*J. macrocarpa*/iglice i *J. sabina*/šišarke). Rezultati koji su dobijeni za etarska ulja su istog reda veličine kao i rezultati za standardna jedinjenja aspirina (4.98 µg/mL) i kvercetina (53.69 µg/mL), s tim da je IC₅₀ izmerena za etarsko ulje *J. foetidissima*/iglice manja nego IC₅₀ kvercetina. Ovaj rezultat ukazuje na izuzetnu aktivnost etarskog ulja prema inhibiciji produkcije TXB₂, budući da je etarsko ulje smeša velikog broja terpenskih jedinjenja, od kojih su samo neki nosioci

aktivnosti, dok standard predstavlja izolovana supstanca. Etarsko ulje šišarki *J. oxycedrus* ispoljava koncentraciono zavisnu inhibiciju produkcije TXB₂, s tim da ispoljava pro-inflamatorno dejstvo pri manjim koncentracijama. Sa povećanjem koncentracije ovog etarskog ulja, koncentracija posmatranog medijatora inflamacije TXB₂ se smanjuje i dostiže IC₅₀ vrednost pri koncentraciji od 86.54 nL/mL.

IC₅₀ vrednosti inhibicije produkcije PGE₂ ispitanih ekstrakata, etarskih ulja i standardnih inhibitora prikazane su na *Histogramima 4.15. i 4.16.*



Histogram 4.15. Potencijal inhibicije produkcije PGE₂ metabolita standarda i ekstrakata iglica i šišarki i vrste roda *Juniperus*

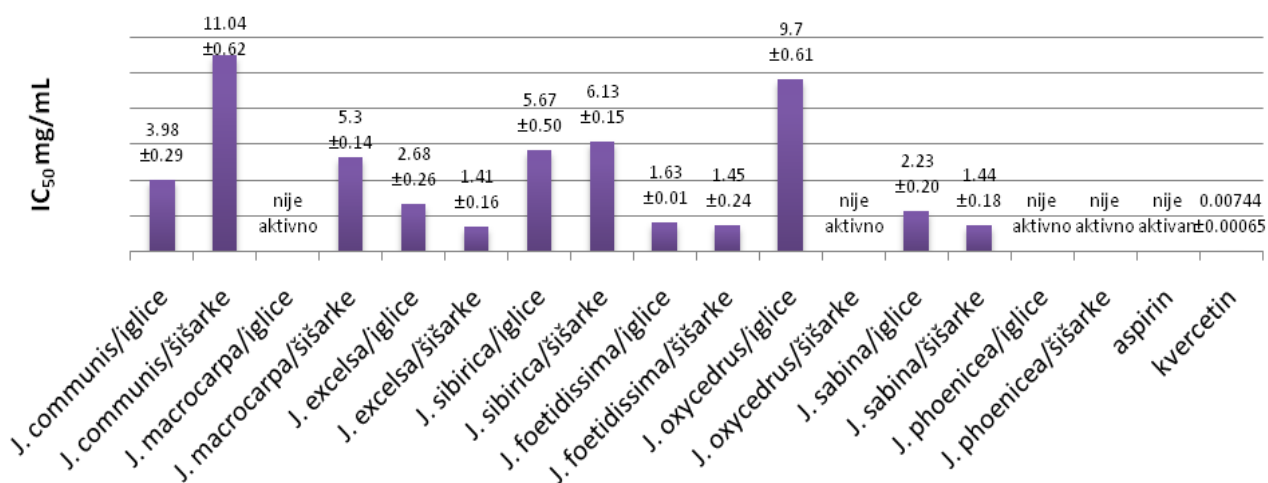


Histogram 4.16. Potencijal inhibicije produkcije PGE₂ metabolita standarda i etarskih ulja iglica i šišarki i vrste roda *Juniperus*

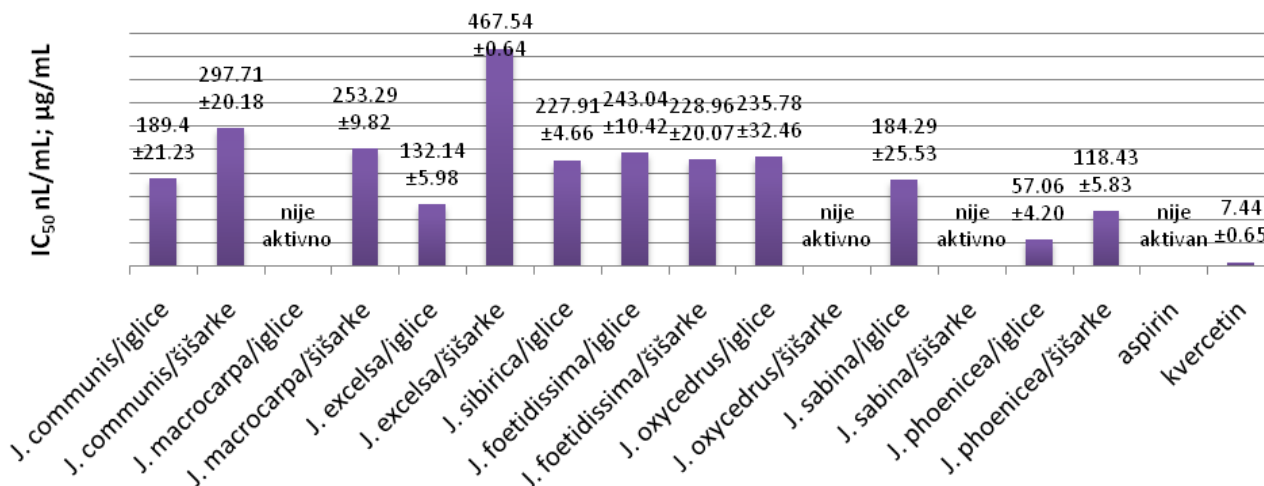
Kao i kod predhodno prikazanih rezultata za proizvode ciklooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline (12-HHT i TXB₂) i kod rezultata vezanih za PGE₂, ekstrakti ispoljavaju slabu, a etarska ulja snažnu aktivnosti pri inhibiciji produkcije ovog metabolita. IC₅₀ postignuta je pri dejstvu samo dva od ispitivanih šesnaest ekstrakata (IC₅₀ = 2.76 mg/mL *J. communis*/iglice; IC₅₀ = 4.16 mg/mL *J. sibirica*/iglice). Ekstrakt šišarki vrste *J. macrocarpa* ispoljava snažnu pro-inflamatornu aktivnost, budući da se koncentracija PGE₂ u trombocitima povećava sa povećanjem koncentracije ekstrakta (*Grafik 8.59.*). Ostali ekstrakti nisu pokazali doznu zavisnost prema inhibiciji produkcije PGE₂ metabolita.

Trinaest od ispitivanih petnaest etarskih ulja pokazuje koncentraciono zavisnu inhibiciju produkcije PGE₂, gde su određene IC₅₀ vrednosti bile između 71.84 nL/mL (*J. foetidissima*/iglice) i 529.90 nL/mL (*J. macrocarpa*/šišarke). Etarsko ulje šišarki *J. oxycedrus* pri nižim ispitivanim koncentracijama ispoljava pro-inflamatorno dejstvo (*Grafik 8.36.*). Poredeći dobijene rezultate sa rezultatima ispitivanih standardnih supstanci (IC₅₀ = 5.58 µg/mL aspirin; IC₅₀ = 12.75 µg/mL kvercetin), etarska ulja imaju umerenu aktivnost.

Na *Histogramima 4.17.* i *4.18.* prikazane su IC₅₀ vrednosti inhibicije produkcije 12-HETE metabolita za ispitivane ekstrakte, etarska ulja i standardne supstance.



Histogram 4.17. Potencijal inhibicije produkcije 12-HETE metabolita standarda i ekstrakata iglica i šišarki i vrste roda *Juniperus*



Histogram 4.18. Potencijal inhibicije produkcije 12-HETE metabolita standarda i etarskih ulja iglica i šišarki i vrste roda *Juniperus*

Određene IC₅₀ vrednost potencijala inhibicije produkcije 12-HETE metabolita, kao pokazatelja aktivnosti 12-LOX, ispitivanih ekstrakata kleke iznosile su od 1.41 (*J. excelsa*/šišarke) do 11.04 mg/mL (*J. communis*/šišarke). Ovakav rezultat ukazuje na slabu aktivnost ekstrakata kleke pri inhibiciji 12-LOX enzima.

Etarska ulja pokazala su bolji potencijal inhibicije produkcije 12-HETE metabolita, u odnosu na ekstrakte. Određene IC₅₀ vrednosti iznosile su od 57.06 (*J. phoenicea*/iglice) do 467.54 nL/mL (*J. excelsa*/šišarke). IC₅₀ vrednost nije postignuta pri dejstvu tri etarska ulja (*J. macrocarpa*/iglice, *J. oxycedrus*/šišarke i *J. sabina*/šišarke). Dobijeni rezultati za etarska ulja su istog reda veličine kao i rezultat za standardno jedinjenje kvercetin (7.44 µg/mL), koji potvrđuju dobar potencijal etarskih ulja i terpenoidnih jedinjenja u inhibiciji 12-LOX.

Poznato je da su fenolna jedinjenja nosioci mnogih bioloških aktivnosti. U cilju utvrđivanja doprinosa fenolnih jedinjenja antiinflamatornom potencijalu ispitivanom u ovom radu, primenjena je regresiona analiza. Primenom regresione analize izračunati su korelacioni faktori između ukupnog sadržaja fenola, odnosno flavonoida i sposobnosti ispitivanih ekstrakata (izražene kao recipročne vrednosti izračunatih IC₅₀), kod kojih je postignuta IC₅₀ vrednost, da inhibiraju produkciju ispitivanih metabolita. (Tabela 4.2.)

Tabela 4.2. Korelacioni faktor (R^2) između ukupnog sadržaja fenola i flavonoida i kapaciteta inhibicije produkcije 12-HHT, TXB₂ i 12-HETE

	Korelacioni faktor (R^2)		
	Kapacitet inhibicije produkcije metabolita		
	12-HHT	TXB ₂	12-HETE
Ukupni fenoli	0.6823	0.6659	0.6145
Ukupni flavonoidi	0.6602	0.8460	0.7160

Dobijeni faktori korelacije između ukupnog sadržaja fenola i flavonoida i potencijala inhibicije ispitivanih metabolita, ukazuju na umereni uticaj ove grupe jedinjenja pri inhibiciji produkcije 12-HHT, TXB₂ i 12-HETE u ispitivanim ekstraktima. Određeni faktori pokazuju da i druge grupe jedinjenja, pored fenola i flavonoida, doprinose antiinflamatornoj aktivnosti ekstrakata. U određivanju korelacionih faktora, nisu uzeti u obzir ekstrakti kod kojih IC₅₀ vrednost nije postignuta. Međutim, ekstrakti kod kojih je to slučaj, imaju nizak sadržaj ukupnih fenola i flavonoida, tako da određeni korelacioni faktori prikazuju realan nivo uticaja ovih jedinjenja na nivo produkcije ispitivanih metabolita. Korelacioni faktori za PGE₂ nisu uzeti u obzir, zato što je potencijal inhibicije ovog metabolita određen samo za dva ispitivana ekstrakta.

Određivanjem potencijala inhibicije produkcije tri metabolita (12-HHT, TXB₂ i PGE₂) ciklooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline, dobija se kompletnija slika mehanizma delovanja ispitivanih ekstrakata i etarskih ulja vrsta roda *Juniperus* na pomenuti metabolički put. U *Poglavlju 2.3.2.* detaljno je opisan mehanizam nastajanja ispitivanih produkata. Dejstvo tromboksan sintaze na PGH₂ vodi ka nastajanju primarnog proizvoda TXA₂, koje obuhvata: homolitičko raskidanje endoperoksidne veze PGH₂ katalizovano Fe(II) jonom, nastajanje alkoksi radikala, jonsko premeštanje, oksidaciju do karbokationa i eliminaciju protona, nakon čega TXA₂ podleže neenzimskoj degradaciji i nastaje stabilan metabolit TXB₂. Međutim, ako se elektronski transfer odigrava sporo, onda dolazi i do fragmentacije, odnosno nastajanja malondialdehida i metabolita 12-HHT (*Slika 2.17.*; Hecker i Ullrich, 1989; Marks i Fürstenberg, 1999). Kao što je prikazano u procesu sinteze TXB₂ i 12-HHT, neenzimske transformacije uključuju nastajanje radikalskih vrsta. Imajući u vidu da je antioksidantni potencijal ispitivanih uzoraka kleke dobar, kako je prikazan u ovom radu, postoji velika mogućost da ispitivani biljni preparati deluju na inhibiciju sinteze TXB₂ i 12-HHT upravo preko neutralizacije radikalskih vrsta uključenih u ovaj process. Naime, kod

najvećeg broja ispitivanih uzoraka, gde je IC₅₀ vrednost za inhibiciju produkcije 12-HHT i TXB₂ slična, može se smatrati da ispitivani ekstrakti i etarska ulja deluju na prvu fazu aktivnosti tromboksan sintaze i tako inhibiraju nastanak oba proizvoda podjednako. Međutim, ako 12-HHT nastaje u većoj količini, odnosno ako je IC₅₀ za ovaj proizvod veća, onda ispitivan ekstrakt ili etarsko ulje najverovatnije deluje u fazi oksidacije i premeštanja i obrnuto.

Značajni antiinflamatorni potencijal etarskih ulja i ekstrakata vrsta roda *Juniperus* utvrdili su i drugi autori (Tabela 2.5.). U nekim od dostupnih radova, antiinflamatorni potencijal određen je zastarelim *in vivo* testovima na eksperimentalnim životinjama, koji ne pružaju potpunu sliku o mehanizmu delovanja ispitivanih supstrata. Ostali dostupni radovi ukazuju na dobar potencijal inhibicije kleke u produkciji drugih medijatora inflamacije, kao što su: TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10 i Nf- κ B. Svega dva naučna rada potvrđuju potencijal vrsta kleke u inhibiciji metabolizma arahidonske kiseline i to za ekstrakt šišarki *J. communis* (Tunón i sar., 1995; Schneider i sar., 2004). Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj tezi potvrđuju dobar antiinflamatorni potencijal ispitivanih vrsta kleke i pre svega, daju detaljniju sliku o mehanizmu delovanja ispitivane biljne vrste na medijatore inflamacije koji su produkti metabolizma arahidonske kiseline.

Poredeći rezultate između ekstrakata i etarskih ulja može se zaključiti da etarska ulja kleke ispoljavaju višestruko jači potencijal inhibicije produkcije ispitivanih metabolita arahidonske kiseline. Velika razlika u aktivnosti najverovatnije potiče od različite aktivnosti i prirode jedinjenja koja su prisutna u ekstraktima i etarskim uljima. Dobijeni rezultati ukazuju da terpenoidna jedinjenja ispoljavaju značajan potencijal inhibicije nastajanja produkata metabolizma arahidonske kiseline, za razliku od fenolnih jedinjenja, koja u ispitivanim uslovima pokazuju znatno manju aktivnost. Takođe, razlika u aktivnosti može da potiče i od razlike u polarnosti ispitivanih supstrata. Naime, nepolarna priroda ispitivanih metabolita može znatno da utiče na to da je primenjena metoda osetljivija za nepolarne supstrate, kakva su etarska ulja. U pogledu antiinflamatorne aktivnosti ispitanih ekstrakata kleke, ukupna aktivnost je opadala u sledećem nizu: *J. foetidissima* > *J. sabina* > *J. excelsa* > *J. communis* > *J. sibirica* > *J. macrocarpa* > *J. oxycedrus* > *J. phoenicea*. Poredeći dobijene rezultate u pogledu antiinflamatorne aktivnosti etarskih ulja, vrste su rangirane od najpotentnije: *J.*

sabina > *J. phoenicea* > *J. oxycedrus* > *J. foetidissima* > *J. communis* > *J. excelsa* > *J. sibirica* > *J. macrocarpa*

U poređenju aktivnosti između iglica i šiškarki iste vrste, ne može se zaključiti koji deo biljke pokazuje bolju aktivnost pri inhibiciji produkcije ispitivanih metabolita (12-HHT, TXB₂, PGE₂ i 12-HETE), budući da nije bilo moguće izvesti bilo kakvu zakonitost u razlikama aktivnosti ova dva dela biljke.

Zanimljivo je da ekstrakti šiškarki *J. oxycedrus* i *J. macrocarpa* ispoljavaju snažno pro-inflamatorno delovanje, gde se sa povećanjem koncentracije ekstrakata povećava koncentracija TXB₂, odnosno PGE₂ metabolita. Analizom rezultata fenolnog sastava ekstrakata koji su predstavljeni u ovom radu, ne može se zaključiti koja fenolna komponenta je odgovorna za specifično delovanje ovih ekstrakata, budući da se posebno ne izdvaja sadržaj ni jednog fenolnog jedinjenja. Da bi se zaključilo koji prirodni proizvodi su nosioci ovako specifične aktivnosti, potrebno je sprovesti detaljniju hemijsku analizu. Takođe, kako pro-inflamatorno dejstvo nije poželjno, treba razmotriti i bezbednost ovih biljnih preparata.

Uopšteno, prikazani rezultati antiinflamatornog potencijala ekstrakata i etarskih ulja osam vrsta kleke su od velikog značaja, s obzirom na to da po prvi put pokazuju antiinflamatorni potencijal većine vrsta u pogledu inhibicije metabolizma arahidonske kiseline. Takođe, metoda prikazana u ovom radu je modifikovana i proširena metoda, koja omogućuje specifično praćenje koncentracije ispitivanih metabolita i daje detaljniju sliku o mehanizmu nastajanja eikozanoida. Dalja istraživanja su neophodna radi identifikacije jedinjenja koja su nosioci značajnog antiinflamatornog potencijala kod ispitivanih vrsta, posebno u smislu određivanja aktivnih terpenoidnih jedinjenja, a u cilju njihove potencijalne primene kao antiinflamatornih, odnosno lekovitih agenasa.

4.4. Antimikrobni potencijal

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti 14 odabranih etarskih ulja vrsta roda *Juniperus* na šest bakterijskih vrsta (Gram pozitivne: *S. aureus* i *C. perfringens*; Gram negativne: *A. baumannii*, *E. coli*, *S. enteritidis* i *P. aeruginosa*), koja su izvedena primenom disk difuzione metode i određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) agar dilucionom metodom, prikazani su u *Poglavlju 8.4.* u *Tabelama 8.79.* i *8.80.*

Gram pozitivna bakterija *S. aureus* pokazala je osetljivost na etarska ulja iglica i šišarki svih ispitivanih vrsta roda *Juniperus* u opsegu ispitanih koncentracija u oba primenjena testa. Zone inhibicije rasta *S. aureus* od strane etarskih ulja, određene disk difuzionom metodom, kretale su se od 12.3 do 23.3 mm. Stepem osetljivosti ove bakterije na etarska ulja različitih vrsta, određen dilucionom metodom, bio je sličan (MIC = 4-8 $\mu\text{L}/\text{mL}$), osim kada su u pitanju ulja *J. macrocarpa*/šišarke i *J. sibirica*/iglice, za koja su dobijene nešto više vrednosti (MIC = 16 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Neophodno je naglasiti da je pri diskusiji efikasnosti etarskih ulja, na osnovu dostupnih literaturinih podataka i vrednosti MIC-ja dobijenih u ovoj doktorskoj tezi, korišćen navedeni kriterijum: MIC < 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ dobar efekat, 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ < MIC < 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ umeren efekat, 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ < MIC \leq 16 $\mu\text{L}/\text{mL}$ slab efekat, MIC > 16 $\mu\text{L}/\text{mL}$ bez efekta. Osetljivost bakterije *S. aureus* na etarska ulja predstavnika roda *Juniperus* detektovali su i drugi autori. Tako su ulja iglica vrste *J. excelsa* sa područja Turske i šišarki *J. communis* sa područja Poljske pokazala značajan efekat na ovu bakteriju (MIC = 9 mg/mL i 1.2 $\mu\text{L}/\text{mL}$) (Filipowicz i sar., 2003; Unlu i sar., 2008). Slično tome, etarsko ulje *J. oxycedrus*/iglice (MIC = 225 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sa Sardinije bilo je veoma efikasno, dok za ulje *J. communis* iglice/šišarke nije postignuta MIC-ja (MIC > 900 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Angioni i sar., 2003). Prikazani rezultati, ukazuju na umeren antimikrobni efekat ispitivanih etarskih ulja na *S. aureus*, što je u skladu sa rezultatima drugih autora. Ispoljena aktivnost je značajna za opštu karakterizaciju bioloških aktivnosti ispitanih vrsta roda *Juniperus*, imajući u vidu da *S. aureus* uzrokuje različite infekcije: kože i mekih tkiva, zglobova i kostiju, urinarnog trakta, respiratornog trakta, uha, endokarditis, abscese na jetri i slezini, kao i oboljenja koja su rezultat produkcije toksina: toksični šok-sindrom, toksoinfekcije hranom usled ingestije bakterije i njenog termostabilnog enterotoksina i sl. Pored toga, ova bakterija pokazuje visok stepen rezistencije na antibiotike, prvenstveno na beta laktame i makrolide koji se najčešće koriste u terapiji infekcija čiji su etiološki faktor Gram pozitivne koke (Brenner i sar., 2005; Pitt i Simpson, 2006). Značaj dobijenih rezultata je još veći kada se uzme u obzir i to da je kao test organizam u ovom istraživanju korišćen referentni soj vrste *S. aureus*, koji produkuje β -laktamaze, tj. soj koji je rezistentan na beta laktamske antibiotike.

C. perfringens je Gram pozitivni štapić koji, za razliku od drugih bakterija ispitivanih u ovom radu, ima mogućnost stvaranja veoma otpornih endospora. Ova bakterija naseljava zemljište, a prodire u organizam preko rana uzrokujući nekrozu tkiva. Pored toga, uzročnik je

teških trovanja hranom, koja za posledicu imaju nekrotični enteritis i drugih oboljenja prvenstveno gastrointestinalnog trakta (Brenner i sar., 2005; Pitt i Simpson, 2006). Zone inhibicije rasta *C. perfringens* za etarska ulja dobijene disk difuzionom metodom kretale su se od 10.3 do 32.0 mm. Određene minimalne inhibitorne koncentracija za soj *C. perfringen* iznosile su od 2 do 16 $\mu\text{L}/\text{mL}$, pri čemu je najniža MIC vrednost za ovu bakteriju utvrđena za etarsko ulje *J. macrocarpa*/iglice (MIC = 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$), a to je ujedno najmanja MIC detektovana u ovom radu. Osetljivosti *C. perfringens* na etarska ulja predstavnika roda *Juniperus* utvrdili su i drugi autori. Tako su Unlu i saradnici (2008) odredili da je MIC za ovu bakteriju, kada je u pitanju etarsko ulje iglica vrste *J. excelsa* sa područja Turske, koji je iznosio 2.25 mg/mL.

Zanimljivo je primetiti i to da su etarska ulja šišarki svih vrsta, čija su etarska ulja iglica i šišarki ispitivana paralelno, u istoj ili češće većoj koncentraciji inhibirala rast Gram pozitivnih bakterija. Za razliku od rezultata dobijenih u ovom radu, Stassi i saradnici (1996) su ispitujući etarska ulja različitih vrsta kleke: *J. drupacea* Labill., *J. oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sm.) Ball, *J. oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* i *J. phoenicea* L., utvrdili da etarska ulja šišarki pokazuju bolji efekat na ispitivane sojeve bakterija, pri čemu je ulje *J. oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* bilo najefikasnije. Ove i druge razlike u rezultatima, kada su u pitanju etarska ulja istih vrsta roda *Juniperus*, koji su dobijeni u ovoj tezi u odnosu na rezultate drugih autora, kao i prilikom međusobnog poređenja rezultata drugih autora, mogu se objasniti razlikama u geografskom poreklu biljke, različitom vegetacionom periodu u kom je biljni materijal sakupljen, starosti biljaka, metodama izolacije etarskih ulja kao i metodama ispitivanja antimikrobne aktivnosti.

Zanimljivo je primetiti i to da je disk difuzionim metodom utvrđena bolja osetljivost *C. perfringens* na ispitivana ulja u odnosu na *S. aureus*, dok su rezultati određivanja MIC agar dilucionom metodom pokazali obrnuto. Iako ovaj fenomen nije neuobičajen, razlika u rezultatima može se pripisati nedostatku metode korištene za određivanje MIC. Naime, rast nekoliko pojedinačnih kolonija na mestu inokulacije uzima se kao odsustvo rasta, s obzirom na početnu brojnost bakterijskih ćelija u inokulumu. Pošto *C. perfringens*, za razliku od vrste *S. aureus*, stvara nešto krupnije kolonije, razlikovanje konfluentnog rasta na mestu inokulacije kapi suspenzije i rasta pojedinačnih kolonija nije uvek moguće. Zbog toga su i vrednosti MIC-ja verovatno veće za ovu bakteriju u poređenju na *S. aureus*. Pored toga što

agar diluciona metoda ima kao glavni nedostatak trošenje velike količine ulja koje se testira, ova subjektivna procena odsustva rasta takođe joj se može pripisati kao važan nedostatak.

Najosetljivija među ispitivanim Gram negativnim bakterijama bila je vrsta *A. baumannii*. Za većinu etarskih ulja, u okviru ispitivanih koncentracija, određena je zona inhibicije koja je iznosila od 8.0 do 16.3 mm. U poređenju sa antibiotikom amikacinom, čija je zona inhibicije prema *A. baumannii* 21.3 mm, etarska ulja pokazuju umerenu antimikrobnu aktivnost. Pri poređenju rezultata aktivnosti ispitivanih etarskih ulja i antibiotika, koji su prvenstveno korišćeni kao pozitivna kontrola metode, važno je naglasiti da masena koncentracija antibiotika izražena u $\mu\text{g/mL}$, odgovara zapreminskoj koncentraciji etarskog ulja izraženoj u nL/mL . Takođe, treba imati u vidu da je antibiotik čista supstanca, a etarsko ulja smeša velikog broja terpenoida od kojih nisu svi nosioci antimikrobne aktivnosti. U okviru određivanja minimalne inhibitorne koncentracije, osetljivost ove bakterije detektovana je za etarska ulja iglica *J. communis*, *J. foetidissima* i *J. sabina* i uzimajući u obzir dobijene vrednosti MIC-ja, može se okarakterisati kao umerena. Veoma slaba osetljivost ($\text{MIC} \geq 16 \mu\text{L/mL}$) utvrđena je na etarska ulja šišarki vrsta *J. communis*, *J. sabina* i *J. phoenicea*. Osetljivost ove bakterije na etarska ulja vrsta roda *Juniperus* nije iznenađujuće, imajući u vidu da je prethodno detektovana i od strane Filipowicz i saradnici (2003), koji su utvrdili dobar efekat etarskog ulja šišarki *J. communis* na *A. baumannii* ($\text{MIC} = 0.8 \mu\text{L/mL}$). Rezultati dobijeni u okviru ove teze za soj *A. baumannii* su od izuzetnog značaja iz više razloga. Naime, ova vrsta uzrokuje niz oboljenja: infekcije rana i urinarnog trakta, bakterijemije, meningitis i sl., pri čemu se posebno veliki problem javlja u pedijatriji, budući da je ova bakterija prirodno rezistentna na mnoge antibiotike, a neke od komercijalnih antibiotika nije moguće primeniti u lečenju infekcija kod dece zbog njihove visoke toksičnosti. Takođe, ova bakterija je uzročnik intrahospitalnih infekcija i veoma često je multiplo-rezistentna na mnoge komercijalne antibiotike (Brenner i sar., 2005; Pitt i Simpson, 2006). Iz navedenih razloga bilo bi zanimljivo proučiti *in vivo* efekat etarskih ulja iglica *J. communis*, *J. foetidissima* i *J. sabina* na ovu vrstu bakterija u slučaju infekcija rana multiplorezistentnim sojevima.

U okviru određivanja antimikrobnog potencijala etarskih ulja vrsta roda *Juniperus* prema ostalim ispitivanim Gram negativnim bakterijama (*E. coli*, *S. enteritidis* i *P. aeruginosa*) disk difuzionom metodom, zone inhibicije bile su u opsegu 7.0-15.0 mm (kod nekih ulja zone

inhibicije nisu detektovane), što se karakteriše kao umerena do slaba aktivnost u poređenju sa Gram pozitivnim bakterijama. U slučaju određivanja MIC, osetljivost ostalih Gram negativnih bakterija, sa izuzetkom *E. coli* na etarsko ulje iglica vrste *J. sabina*, bila je izuzetno slaba, a u slučaju *P. aeruginosa* antimikrobni efekat nije ni detektovan. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim nalazima drugih autora, uključujući i utvrđenu bolju osetljivost *E. coli* na etarska ulja u odnosu na vrstu *S. enterica* (Ayachi i sar., 2009). Uzimajući u obzir osetljivost *E. coli*, *S. enterica* serovar. Enteritidis i *P. aeruginosa* na etarska ulja iglica *J. sabina* i *J. foetidissima*, kao i činjenicu da ove tri bakterije uzrokuju poremećaje funkcionisanja gastro-intestinalnog trakta, pomenuta etarska ulja imaju značajan potencijal primene kao aditivi hrani.

Uopšteno, prema rezultatima dobijenim u oba testa u okviru evaluacije antimikrobnog potencijala etarskih ulja iglica i šišarki osam vrsta kleke, značajan efekat na rast Gram negativnih bakterija u ispitivanom opsegu koncentracija pokazala su etarska ulja iglica i šišarki *J. communis* i *J. sabina*, iglica *J. foetidissima* i šišarki *J. phoenicea*. Ostala etarska ulja pokazala su slabu ili nikakvu aktivnost prema ispitivanim bakterijskim sojevima, dok je slaba antibakterijska aktivnost etarskog ulja vrste *J. excelsa* na ovu grupu bakterija detektovana i od strane Unlu i saradnika (2008) (MIC > 72 $\mu\text{L}/\text{mL}$), a za etarsko ulje *J. oxycedrus* od strane Angioni i saradnika (2003) (MIC > 900 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Kad se porede rezultati antimikrobne aktivnosti etarskih ulja iglica i šišarki iste vrste kleke prema ispitivanim sojevima Gram negativnih bakterija, može se zaključiti da etarska ulja iglica imaju veći antimikrobni potencijal. Takođe, etarska ulja pokazala su veći antimikrobni potencijal prema sojevima Gram pozitivnih bakterija, u odnosu na Gram negativne, što se objašnjava prisustvom spoljašnje i plazmalne membrane kod Gram negativne bakterije, pri čemu spoljašnja membrana verovatno predstavlja barijeru za ispoljavanje antimikrobnog efekta etarskih ulja.

Dobijene rezultate antimikrobne aktivnosti odabranih ulja zanimljivo je razmotriti i sa aspekta hemijskog sastava pojedinačnih etarskih ulja. Angioni i saradnici (2003) utvrdili su da sabinen ima značajan antimikrobni efekat na *S. aureus* (MIC = 450 $\mu\text{g}/\text{mL}$), a u okviru ove teze osetljivost *S. aureus* utvrđena je za sva ispitivana etarska ulja, sa vrednostima MIC-ja od 4 do 16 $\mu\text{L}/\text{mL}$, pri čemu sabinen nije detektovan ili se nalazi u tragovima u nekim od etarskih ulja (Tabela 8.2.) koja su pokazala značajnu aktivnost (npr. etarska ulja iglica *J.*

macrocarpa i *J. excelsa* i iglica i šišarki *J. phoenicea*). Slab efekat α -pinena na *S. aureus* utvrdili su mnogi autori (Angioni i sar., 2003; Filipowicz i sar., 2003; Unlu i sar., 2008), a rezultati ove teze takođe ukazuju da ne postoji veza između prisustva i koncentracije ovog monoterpenskog ugljovodonika u etarskim uljima sa jedne strane i osetljivosti ove bakterije sa druge strane.

Unlu i saradnici (2008) su ispitali efekat etarskog ulja šišarki *J. excelsa* sa područja Turske i α -pinena na *C. perfringens*, pri čemu su dobili iste MIC-je (2.25 mg/mL). Iako su njihovi rezultati ukazali na potencijalni efekat α -pinena na ovu bakteriju, rezultati ove teze ne potvrđuju prikazane nalaze. Naime, rezultati dobijeni u ovom radu ukazuju da prisustvo i koncentracija α -pinena u uljima nije u korelaciji sa osetljivošću bakterije *C. perfringens*, tako da npr. etarsko ulje vrste *J. sabina* sa svega 2-3% ovog jedinjenja (2.7% iglice, 2.4% šišarke) pokazuje bolji efekat na ovu bakteriju od etarskih ulja *J. excelsa*, u čijim iglicama i šišarkama je detektovano 30.9%, odnosno 76.7% α -pinena.

Monoterpenski ugljovodonici α - i β -pinen, sabinen, β -mircen, p-cimen i limonen, prema podacima iz literature, pokazuju slab antibakterijski efekat na Gram negativne bakterije (Angioni i sar., 2003; Filipowicz i sar., 2003). Osetljivost ovih bakterija na 4-terpineol nije zanemarljiv i njegov efekat je značajan kada su u pitanju Gram negativne bakterije *E. cloace* i *K. pneumoniae*, ali ne i *A. baumannii* (Angioni i sar., 2003; Filipowicz i sar., 2003). Umeren antimikrobni efekat na *E. coli* i *P. aeruginosa* utvrđen je prethodno i za δ -3-karen. Ovo jedinjenje nije detektovano u onim etarskim uljima koja su ispitivana u ovoj tezi, a koja su pokazala efekat na Gram negativne bakterije, sem u etarskom ulju iglica *J. excelsa* gde je δ -3-karen prisutan u malom udelu, 3.9%. Uzimajući u obzir aktivnost monoterpenskog alkohola 4-terpineola, zanimljivo je primetiti da je ovaj terpen detektovan samo u uljima koja su imala efekat na Gram negativne bakterije i to u procentu od 2.0 do 17.0%, pri čemu je koncentracija bila najveća u etarskim uljima iglica *J. communis*, *J. foetidissima* i *J. sabina*, a koja su pokazala i najbolji efekat na ove mikroorganizme. Dakle, rezultati ukazuju na jasnu vezu između antimikrobne aktivnosti etarskih ulja na Gram negativne bakterije i prisustva 4-terpineola u njima.

Kada se uporedi sadržaj etarskih ulja iglica *J. communis*, *J. foetidissima* i *J. sabina*, koja su dala najmanje vrednosti MIC, tj. koja su se pokazala kao najefikasnija u kontroli rasta *A. baumannii* i *E. coli*, može se primetiti da su ulja po sastavu slična, a ako se izuzmu sabinen,

α -pinen, β -mircen i 4-terpineol, za koje je ranije utvrđen efekat na ove bakterije, rezultati ukazuju na potrebu da se ispita i efikasnost α -tujena, γ -terpinena, α -terpinolena i α -terpinena, pošto su ih sva etarska ulja sadržala sa udelom $> 1\%$ (Tabela 8.2.). Kada se uzme u obzir i utvrđena efikasnost *J. foetidissima* na vrstu *S. enterica* serotip. Enteritidis, posebno je značajno proučiti da li α -terpinen i γ -terpinen pokazuju sinergistički efekat u odgovarajućem odnosu, jer su ova jedinjenja prisutna i u etarskom ulju iglica i šišarki *J. communis* i *J. excelsa*, i to u oko dva puta manjoj koncentraciji u etarskom ulju šišarki, koje je imalo slabiji efekat.

Po svom sastavu, etarska ulja *J. phoenicea* se značajno razlikuju od etarskih ulja drugih ispitivanih vrsta kleke, koje deluju na Gram negativne bakterije. Etarsko ulje šišarki ove vrste pokazuje izvestan efekat na Gram negativne bakterije, za razliku od ulja iglica. Ispitivanjem antimikrobnog delovanja etarskih ulja iglica vrste *J. phoenicea* sa područja Alžira, u opsegu koncentracija 2-10 $\mu\text{L}/\text{mL}$, Mazari i saradnici (2010) su agar dilucionom metodom ustanovili da ova etarska ulja deluju na *E. faecalis* (MIC = 7 $\mu\text{L}/\text{mL}$), ali ne i na *P. aeruginosa*, *E. coli*, *B. subtilis* i *S. aureus*. Etarska ulja šišarki i iglica ove vrste kleke, koja su analizirana u ovom radu, nisu se značajno razlikovala u kvalitativnom sastavu, ali za neka jedinjenja jesu, kao što su α - i β -pinen, i to u korist šišarki, što može da bude smernica za dalja ispitivanja antimikrobnog efekta ovih komponenti u smeši, koristeći njihov kvantitativni odnos u etarskom ulju šišarki i listova koji deluju na Gram negativne bakterije (*A. baumannii* i *E. coli*).

Na osnovu podataka iz literature i rezultata dobijenih u ovom radu, nije moguće tačno utvrditi koje terpensko jedinjenje u smeši je odgovorno za antimikrobni efekat. Poznato je da komponente terpenskih smeša ispoljavaju sinergistički, aditivni ili antagonistički efekat u odnosu na izolovane komponente. Rezultati ove teze potvrđuju taj stav, ali usled nedovoljne istraženosti delovanja koja mogu da ispolje različite smeše terpenskih jedinjenja, još uvek nije moguće zaključiti koje komponente i u kom odnosu imaju najbolji biopotencijal.

Sumarno, rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti etarskih ulja iglica i šišarki odabranih vrsta roda *Juniperus*, dobijeni primenom disk difziona metode, pokazuju da pojedina etarska ulja nemaju antimikrobnu aktivnost u ispitanom koncentracionom opsegu, dok su se zone inhibicije etarskih ulja koja su pokazala efekat kretale od 7 do 32 mm. Pri

tome je utvrđen znatno bolji efekat svih ulja na Gram pozitivne bakterije u odnosu na Gram negativne.

U testu gde se antimikrobna aktivnosti etarskih ulja utvrđivala dilucionom metodom i određivanjem MIC-je, sva ispitivana ulja inaktivirala su bakterijske sojeve *S. aureus* i *C. perfringens* pri koncentracijama od 2 do 16 µL/mL. MIC-je za Gram negativne bakterije kretale su se od 8 do ≥ 16 µL/mL, pri čemu je šest etarskih ulja imalo efekat u ispitivanom opsegu koncentracija na *A. baumannii* i *E. coli*, a samo dva na *S. enterica* serovar. Enteritidis. Maksimalna ispitivana koncentracija ni jednog od odabranih etarskih ulja nije inhibirala rast Gram negativne bakterije *P. aeruginosa*.

Sumarno, rezultati antimikrobne aktivnosti ukazuju na to da odabrana etarska ulja pokazuju antimikrobni efekat na Gram pozitivne bakterije, dok je efekat na Gram negativne bakterije daleko slabiji. Osetljivost ispitivanih vrsta bakterija na odabrana etarska ulja različitih vrsta roda *Juniperus* na osnovu određenih vrednosti MIC-je može se prikazati na sledeći način, od najosetljivije do najrezistentnije: *S. aureus* > *C. perfringens* > *A. baumannii* > *E. coli* > *S. enterica* serotip. Enteritidis > *P. aeruginosa*.

Kad se uzmu u obzir ukupni rezultati dobijeni agar dilucionom metodom i određivanjem najmanje inhibitorne koncentracije na šest sojeva bakterija, relativnim poređenjem može se zaključiti redosled antimikrobnog potencijala vrsta kleke koja su ispitivana u ovom radu, od najpotentnije vrste *J. sabina* > *J. communis* > *J. phoenicea* > *J. foetidissima* > *J. macrocarpa* > *J. oxycedrus* > *J. excelsa* > *J. sibirica*. Takođe, etarska ulja iglica ispitivanih vrsta pokazala su bolji antimikrobni potencijal od etarskih ulja šiškarki, što je posledica prisustva različitih terpenskih komponenti. Dobijeni rezultati ukazuju da su etarska ulja vrsta *Juniperus* umereni antimikrobni agensi i da predstavljaju dobar izvor potentnih antimikrobnih terpenskih jedinjenja. Ova činjenica ide u prilog nastavku istraživanja na ovom polju, kako bi se utvrdilo koji terpenoidi su nosioci aktivnosti i kako deluju na mikroorganizme kao izolovane komponente i u odgovarajućim smešama, a sve u cilju razmatranja njihove potencijalne primene u terapijske svrhe i kao konzervanasa u prehrambenoj industriji.

5. ZAKLJUČAK

U okviru ove doktorske teze izvršena su detaljna hemijska, biohemijska i biološka ispitivanja metanolnih ekstrakata i etarskih ulja iglica i šišarki osam vrsta roda *Juniperus*, sakupljenih na različitim lokalitetima Republike Srbije, Hrvatske i Makedonije (*Juniperus communis* L. 1753 var. *communis*, *Juniperus macrocarpa* Sibth. et Sm 1816, *Juniperus excelsa* M. Bieb. 1800, *Juniperus sibirica* Burgsdorf. 1787, *Juniperus foetidissima* Willd. 1806, *Juniperus oxycedrus* L. 1753 var. *oxycedrus*, *Juniperus sabina* L. 1753 var. *sabina* i *Juniperus phoenicea* L. 1753 var. *phoenicea*).

Fitohemijski skrining obuhvatao je:

- kvalitativnu i kvantitativnu analizu 44 odabrana fenolna jedinjenja (14 fenolnih kiselina, 25 flavonoida, 3 kumarina i 2 lignana) u metanolnim ekstraktima iglica i šišarki 8 vrsta roda *Juniperus* visoko selektivnom i specifičnom LC-MS/MS tehnikom. U ispitivanim ekstraktima najzastupljenija fenolna jedinjenja su: katehin, rutin, kvercitrin i epikatehin. Takođe, ove komponente bile su prisutne u većoj količini u ekstraktu iglica nego u ekstraktu šišarki ispitivanih vrsta. Katehin je najzastupljenija ispitivana fenolna komponenta, sa izraženom razlikom u količini u kojoj je prisutna u ekstraktu iglica u odnosu na onu u ekstraktu šišarki (iglice 29.47-234.44 mg/mL; šišarke 0.015-61.36 mg/mL). Vrste koje se izdvajaju po velikoj količini katehina u oba ekstrakta su *J. excelsa*, *J. foetidissima* i *J. sibirica*. Sadržaj rutina razlikuje se po količini između ekstrakata iglica i šišarki (0.038-198.71 mg/mL iglice; 0.008-45.86 mg/mL šišarke), dok se vrsta *J. sibirica* izdvaja visokim, a *J. phoenicea* izrazito niskim sadržajem rutina u poređenju sa ostalim ispitivanim vrstama. Ekstrakti iglica i šišarki razlikuju se po sadržaju kvercitrina, ali ne tako značajno kao prethodno pomenute komponente (0.12-141.87 mg/mL iglice; 0.003-67.42 mg/mL šišarke). Vrste koje se izdvajaju po višem sadržaju kvercitrina su *J. excelsa*, *J. foetidissima* i *J. sabina*. Sadržaj epikatehina u ekstraktima iglica i šišarki ne razlikuje se značajno (17.80-78.39 mg/mL iglice; 0.007-24.35 mg/mL šišarke), dok se vrsta *J. foetidissima* značajno izdvaja po sadržaju epikatehina u oba ispitivana dela biljke. Pored pomenutih fenolnih komponenti, koje su zastupljene kod svih ispitivanih vrsta, neki ekstrakti se izdvajaju po sadržaju pojedinačnih fenola u poređenju sa ostalim ispitivanim ekstraktima.

Ekstrakt iglica *J. communis* izdvaja se sadržajem kumarina umbeliferona (38.10 mg/mL) i fenolnih kiselina ferulne i kafene (4.64 i 0.77 mg/mL). Takođe, ekstrakt iglica *J. sibirica* izdvaja se sadržajem ferulne kiseline (2.03 mg/mL), dok se ekstrakt iglica i šišarki *J. excelsa* izdvaja po sadržaju flavonoida viteksina (0.12 i 0.16 mg/mL), koji se ili nalazi u tragovima ili nije detektovan u ostalim ekstraktima. Dobijeni rezultati predstavljaju prve podatke o fenolnom sastavu većine ispitivanih vrsta i mogu se potencijalno koristiti kao hemotaksonomski markeri.

- kvalitativnu i kvantitativnu analizu etarskih ulja primenom gasne hromatografije sa masenim detektorom, pri kojoj je utvrđeno prisustvo 77 različitih terpenoidnih komponenti, koje čine od 92.1 do 100% ukupnog sastava etarskih ulja. Dobijeni rezultati ukazuju da se ispitivana etarska ulja odlikuju visokim sadržajem monoterpenskih ugljovodonika (52.1-89.8% iglice; 53.0-89.6% šišarke), gde su dominantne komponente α -pinen (2.7-74.5% iglice; 2.4-76.7% šišarke), sabinen (0.5-84.3% iglice; 0.5-60.9% šišarke), β -mircen (0.9-43.2% iglice; 2.3-10.3% šišarke), 4-terpineol (5.8-17.0% iglice; 2.0-8.2% šišarke) i limonen (3.1-14.8% iglice; 1.5-8.1% šišarke). Posle monoterpenskih ugljovodonika, najprisutniji su seskviterpeni (1.5-41.5% iglice; 5.5-23.2% šišarke), od kojih se ističe sadržaj germakrena D (0.7-18.1% iglice; 0.9-14.3% šišarke). Neki terpenoidi se po količini izdvajaju u pojedinim etarskim uljima i mogu se smatrati karakterističnim za određenu vrstu. Tako se α -pinen u velikom procentu nalazi u etarskim uljima *J. excelsa*/šišarke (76.7%), *J. oxycedrus*/šišarke (75.6%) i *J. sibirica*/iglice (74.5%), dok je u etarskim uljima *J. foetidissima* (3.4% iglice; 3.5% šišarke) i *J. sabina* (2.7% iglice; 2.4% šišarke) prisutan u mnogo manjem procentu. Sabinen je karakterističan za tri ispitivane vrste *J. sabina* (54.3% iglice; 60.9% šišarke), *J. foetidissima* (39.9% iglice; 29.9% šišarke) i *J. communis* (36.3% iglice; 18.6% šišarke), a germakren D za vrste *J. macrocarpa* (18.1% iglice; 13.5% šišarke) *J. sibirica* (4.3% iglice; 14.3% šišarke) i *J. oxycedrus* (11.49% iglice; 3.7% šišarke). Vrsta *J. excelsa* odlikuje se visokim sadržajem kedrola (37.4% iglice; 7.7% šišarke) i niskim sadržajem δ -3-karena (3.9% iglice; 0.8% šišarke), koji su detektovani samo u ovoj vrsti. Vrsta *J. foetidissima* se najviše izdvaja po terpenoidnom sastavu i odlikuje je visok sadržaj oksidovanih monoterpena 4-terpineola (17.0%) i γ -terpinena (10.1%) u iglicama i diterpena abietadiena (8.6%), 4-epi-abietala (8.5%) i

abietola (3.0%). Ovi rezultati ukazuju na to da etarska ulja vrsta *Juniperus* imaju jednostavan terpenški sastav i da se mogu smatrati potentnim izvorom dominantno prisutnih mono- i seskviterpena, kao i da se sastav etarskih ulja može koristiti kao hemotaksonomski marker kod nekih vrsta, dok kod nekih drugih to nije slučaj zbog velike varijabilnosti sadržaja istih komponenti u istoj biljnoj vrsti.

Procena biološkog potencijala obuhvatala je:

- Procenu antioksidantne aktivnosti primenom testova, koji su zasnovani na transferu elektrona (neutralizacija DPPH[•] radikala i određivanje redukcijske sposobnosti - FRAP test), neutralizaciji slobodnoradikalnih vrsta (kapacitet „hvatanja“ HO[•], O₂^{•-} i NO radikala) i potencijalu inhibicije lipidne peroksidacije. Rezultati su poređeni sa aktivnošću sintetičkih antioksidanasa BHA (butilovani hidroksianizol) i BHT (butilovani hidroksitoluen). Dobijeni su sledeći rezultati:
 - ❖ sposobnost neutralizacije DPPH[•] radikala: IC₅₀ vrednosti ispitanih ekstrakata iznosile su od 2.58 do 322.79 µg/mL, a etarskih ulja od 6.89 do 27.04 µL/mL. Najveću aktivnost pokazali su ekstrakti *J. foetidissima*/iglice i *J. sabina*/iglice, čija je aktivnost bila značajno veća nego sintetskim antioksidantima BHT i BHA, dok je najmanja DPPH[•] skevindžer aktivnost nađena kod etarskih ulja *J. oxycedrus*/iglice i *J. sabina*/iglice.
 - ❖ kapacitet „hvatanja“ HO[•] radikala: IC₅₀ vrednosti ispitanih ekstrakata iznosile su od 191.36 do 1034.15 µg/mL. Najveću aktivnost pokazali su ekstrakti *J. excelsa*/iglice i *J. macrocarpa*/šišarke, koja je uporediva sa BHT, a značajno je veća nego aktivnost BHA. Najmanji potencijal „hvatanja“ HO[•] radikala imali su ekstrakti *J. sabina*/šišarke i *J. communis*/iglice.
 - ❖ kapacitet „hvatanja“ O₂^{•-} radikala: IC₅₀ vrednosti ispitanih ekstrakata iznosile su od 31.09 do 611.63 µg/mL. Najveću aktivnost pokazali su ekstrakti *J. foetidissima*/šišarke i *J. sabina*/iglice, dok je najmanja O₂^{•-} skevindžer aktivnost nađena kod ekstrakata *J. phoenicea*/šišarke i *J. macrocarpa*/šišarke.
 - ❖ kapacitet „hvatanja“ NO[•] radikala: IC₅₀ vrednosti ispitanih ekstrakata iznosile su od 0.15 do 0.84 mg/mL. Najveću aktivnost pokazali su ekstrakti *J. sibirica*/iglice i *J. foetidissima*/šišarke, a najmanji potencijal „hvatanja“ NO[•] radikala imali su ekstrakti *J. communis*/šišarke, *J. macrocarpa*/šišarke i *J. macrocarpa*/iglice.

- ❖ inhibicija lipidne peroksidacije: IC₅₀ vrednosti ispitanih ekstrakata iznosile su od 40.41 do 1461.88 µg/mL, a etarskih ulja od 9.98 do 1574.43 nL/mL. Najveću aktivnost pokazalo je etarsko ulje *J. communis*/iglice, čija je aktivnost značajno veća nego sintetskih antioksidanasa BHT i BHA. Najmanji potencijal inhibicije lipidne peroksidacije ima etarsko ulje *J. oxycedrus*/iglice.
- ❖ redukcionni potencijal: u ispitivanim ekstraktima iznosio je od 177.7 do 3.61 mg ekv. askorbinske kis/g s. e. Najveći redukcionni potencijal, i značajno veći od BHT, imaju ekstrakti *J. foetidissima*/iglice i *J. oxycedrus*/iglice, dok ekstrakti *J. phoenicea*/šišarke i *J. macrocarpa*/šišarke imaju najmanji.
- U cilju određivanja korelacije između sadržaja ukupnih fenola i flavonoida i antioksidantne aktivnosti ispitanih ekstrakata, određen je ukupni sadržaj ovi jedinjenja. Dobijeni su sledeći rezultati:
 - ❖ sadržaj ukupnih fenola: u ispitivanim ekstraktima iznosion je od 7.17 do 196.07 mg ekv. galne kiseline/g s. e. (*J. foetidissima*/iglice > *J. excelsa*/iglice > *J. oxycedrus*/iglice > *J. sibirica*/iglice > *J. foetidissima*/šišarke > *J. communis*/iglice > *J. sabina*/iglice > *J. phoenicea*/iglice > *J. macrocarpa*/iglice > *J. excelsa*/šišarke > *J. sibirica*/šišarke > *J. sabina*/šišarke > *J. communis*/šišarke > *J. oxycedrus*/šišarke > *J. phoenicea*/šišarke > *J. macrocarpa*/šišarke)
 - ❖ sadržaj ukupnih flavonoida: u ispitivanim ekstraktima iznosion je od 3.32 do 60.38 mg ekv. kvercetina/g s. e. (*J. foetidissima*/iglice > *J. foetidissima*/šišarke > *J. excelsa*/iglice > *J. oxycedrus*/iglice > *J. sabina*/šišarke > *J. excelsa*/šišarke > *J. sibirica*/iglice > *J. communis*/iglice > *J. sabina*/iglice > *J. sibirica*/šišarke > *J. macrocarpa*/iglice > *J. oxycedrus*/šišarke > *J. phoenicea*/šišarke > *J. communis*/šišarke > *J. macrocarpa*/šišarke > *J. phoenicea*/iglice).

Analizom dobijenih rezultata uočava se da ekstrakti iglica imaju značajno bolju aktivnost od odgovarajućih ekstrakata šišarki, dok se ne može izvesti uopšten zaključak o aktivnosti etarskih ulja. Takođe, ne može da se izvede ni jasan zaključak o odnosu opšte antioksidantne aktivnosti između ekstrakata i etarskih ulja. Uopšteno, dobijeni rezultati pokazuju da su sve ispitane vrste potentni antioksidantni agensi, odnosno da mogu da utiču na sprečavanje slobodnoradikalskih procesa zasnovanih na

transferu elektrona, neutralizaciji slobodnoradikalnih vrsta ili da inhibiraju lipidnu peroksidaciju.

- Procenu antiinflamatornog potencijala primenom metode kojom se određuje stepen inhibicije produkcije tri proizvoda ciklooksigenaznog puta (12-HHT, TXB₂ i PGE₂) i jednog proizvoda lipooksigenaznog puta (12-HETE) metabolizma arahidonske kiseline. Dobijeni su sledeći rezultati:
 - ❖ inhibicija produkcije 12-HHT metabolita: IC₅₀ vrednosti ispitanih ekstrakata iznosile su od 1.13 do 6.32 mg/mL, a etarskih ulja od 45.32 do 490.94 nL/mL. Najveću aktivnost pokazala su etarska ulja *J. foetidissima*/iglice i *J. oxycedrus*/šišarke, čija aktivnost je manja, ali uporediva sa standardima: aspirinom i kvercetinom. Najmanji potencijal inhibicije produkcije 12-HHT imaju ekstrakti *J. communis*/iglice i *J. sibirica*/iglice.
 - ❖ inhibicija produkcije TXB₂ metabolita: IC₅₀ vrednosti ispitanih ekstrakata iznosile su od 0.93 do 11.08 mg/mL, a etarskih ulja od 52.7 do 408.58 nL/mL. Najveću aktivnost pokazalo je etarsko ulje *J. foetidissima*/iglice, čija aktivnost je manja od aspirina, a veća od kvercetina. Najmanji potencijal inhibicije produkcije TXB₂ metabolita imaju ekstrakti *J. communis*/iglice i *J. sabina*/iglice.
 - ❖ inhibicija produkcije PGE₂ metabolita: IC₅₀ vrednosti ispitanih ekstrakata iznosile su od 2.76 do 4.16 mg/mL, a etarskih ulja od 71.84 do 529.90 nL/mL. Najveću aktivnost pokazala su etarska ulja *J. foetidissima*/iglice i *J. phoenicea*/iglice čija aktivnost je manja, ali uporediva sa aktivnosti aspirina i kvercetina. Najmanji potencijal inhibicije produkcije PGE₂ metabolita imaju ekstrakti *J. communis*/iglice i *J. sabina*/iglice.
 - ❖ inhibicija produkcije 12-HETE: IC₅₀ vrednosti ispitanih ekstrakata iznosile su od 21.41 do 110.4 mg/mL, a etarskih ulja od 57.06 do 467.54 nL/mL. Najveću aktivnost pokazala su oba etarska ulja vrste *J. phoenicea*, čija aktivnost je manja, ali uporediva sa aktivnosti aspirina. Najmanji potencijal inhibicije produkcije 12-HETE metabolita imaju ekstrakti *J. oxycedrus*/iglice i *J. communis*/šišarke.

Poredeći potencijal inhibicije produkcije ispitivanih metabolita arahidonske kiseline, može se zaključiti da etarska ulja kleke ispoljavaju višestruko bolju aktivnost od

metanolnih ekstrakata. Ovi rezultati ukazuju na to da terpenoidna jedinjenja imaju bolji antiinflamatorni potencijal od fenolnih i da su dalja istraživanja neophodna u cilju detekcije specifičnih terpenoidnih komponenti, koje mogu biti nosioci ove aktivnosti. Ekstrakti *J. oxycedrus*/šišarke prema produkciji TXB₂ i *J. macrocarpa*/šišarke prema produkciji PGE₂, izdvajaju se po snažnoj pro-inflamatornoj aktivnosti. Ovi rezultati pružaju značajan doprinos opštoj karakterizaciji bioloških aktivnosti kleka, s obzirom na to da prvi svedoče o antiinflamatornoj aktivnosti nekih ispitanih vrsta.

- Procenu antimikrobne aktivnosti etarskih ulja na šest bakterijskih vrsta (Gram pozitivne: *S. aureus* i *C. perfringens*; Gram negativne: *A. baumannii*, *E. coli*, *S. enteritidis* i *P. aeruginosa*), primenom disk difuzione metode i merenjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) agar dilucionom metodom. Dobijeni su sledeći rezultati za ispitivane sojeve: *S. aureus* - zone inhibicije od 12.3 do 23.3 mm, stepen osetljivosti od 4 do 16 µL/mL; *C. perfringens* - zone inhibicije od 10.3 do 32.0 mm, stepen osetljivosti od 2 do 16 µL/mL; *A. baumannii* - zona inhibicije od 8.0 do 16.3 mm, stepen osetljivosti od 8 do ≥16 µL/mL; *E. coli* - zona inhibicije od 8.7 do 15.0 mm, stepen osetljivosti 16 µL/mL i veći; *S. enteritidis* - zona inhibicije od 8.7 do 11.3 mm, stepen osetljivosti 16 µL/mL i veći; *P. aeruginosa* - zona inhibicije od 7.0 do 8.0 mm, a stepen osetljivosti nije detektovan.

Rezultati antimikrobne aktivnosti ukazuju na to da etarska ulja kleke pokazuju značajan antimikrobni efekat na Gram pozitivne bakterije, dok je efekat na Gram negativne bakterije znatno slabiji. Etarska ulja iglica ispitivanih vrsta pokazala su bolji antimikrobni potencijal od etarskih ulja šišarki, što je posledica prisustva većeg broja različitih terpenskih komponenti. Ovi rezultati ukazuju na to da se pojedine vrste mogu smatrati potencijalnim antimikrobnim agensima za kontrolu ispitivanih vrsta bakterija, kao i da su dalja ispitivanja neophodna u cilju određivanja specifičnih terpenoidnih komponenti odgovornih za antimikrobnu aktivnost.

Sumarno, ukupni biopotencijal ispitivanih vrsta kleke, određen na osnovu antioksidantne, antiinflamatorne i antimikrobne aktivnosti, opada u nizu *J. sabina* > *J. foetidissima* > *J. communis* > *J. excelsa* > *J. phoenicea* > *J. macrocarpa* > *J. oxycedrus* > *J. sibirica*. Ovi

rezultati potvrđuju opravdanost široke primene vrsta *J. communis* i *J. oxycedrus* u tradicionalnoj i oficinalnoj medicini, kao i u kulinarstvu, ali ukazuju i na potencijalnu primenu relativno malo poznatih vrsta *J. foetidissima* i *J. excelsa*, kao potentnih fitopreparata, suplemenata u ishrani i izvora novih biološki aktivnih prirodnih proizvoda.

6. SUMMARY

The genus *Juniperus* L. belongs to the family of Cupressaceae and comprises about 70 species which are widely distributed in the Northern Hemisphere. All over the world plants from this genus have always been regarded as a well-known traditional remedy due to their numerous therapeutic properties, such as anti-inflammatory, diuretic, antiseptic (bacterial and fungal), anthelmintic, hypoglycemic, hypotensive, analgesic and abortifacient. In medicinal applications all parts of the plant are used together with the essential oil. Furthermore, these plants are extensively used worldwide in folk medicine for healing various disorders, for example the common cold, urinary and kidney infections, dermatological disorders, bronchitis, pneumonia, dysentery, hemorrhage, rheumatic arthritis, stomachache, diarrhea, hemorrhoids and for regulation of menstruation and in relieving menstrual pains (Kozan et al., 2006; Thomas et al., 2007; Akkol et al., 2009; Miceli et al., 2009). Moreover, plants from the *Juniperus* L. genus, mostly their cones, have widespread application in different European cuisines as a spice which adds "sharp and clear flavour", preferably for pickling meat, particularly wild bird and game (The Silver Spoon, 2005; Hamyl, 2009). In some traditional recipes for preparing meat specialties, juniper cones are used as distinctive ingredients giving the unique taste (Loizzo et al., 2007). Nowadays, juniper cones are used for flavouring different alcoholic drinks. In Serbia, the "Klekovača", a type of juniper brandy, is a very popular alcoholic drink, well-known for its unique aroma with a nice juniper aftertaste, which is very good for appetite whetting. Furthermore, in the production process of gin (Vichi et al., 2005) and the authentic "psiwo kozicowe" beer from Poland (Łuczaj and Szymański, 2007) juniper cones are also used for flavouring.

Nevertheless, only a few species from *Juniperus* genus have previously been investigated concerning detailed chemical characterisation and evaluation of biological activity of their needles and cones. However, phytochemical studies have shown that the *Juniperus* genus contains a great amount of natural products such as flavonoids, neolignans and phenylpropanoids (Abul'saeva and Pashinina, 1982; Nakanishi et al., 2004a; Nakanishi et al., 2004b; Miceli et al., 2009; Iida et al., 2010) and terpenoids (Topçu et al., 1999; Emami et al., 2007; Ennajar et al., 2009; Medini et al., 2010). The most investigated species are *J. communis* (Agelet and Vallès 2003; Gautam et al., 2007) and *J. oxycedrus* (Kozan et al.,

2006; Moreno et al., 1998), while there are only few reports for other species. Therefore in the present study we extensively explored chemical and biological properties of eight *Juniperus* L. species, *Juniperus communis* L. 1753 var. *communis*, *Juniperus macrocarpa* Sibth. et Sm 1816, *Juniperus excelsa* M. Bieb. 1800, *Juniperus sibirica* Burgsdorf. 1787, *Juniperus foetidissima* Willd. 1806, *Juniperus oxycedrus* L. 1753 var. *oxycedrus*, *Juniperus sabina* L. 1753 var. *sabina* and *Juniperus phoenicea* L. 1753 var. *phoenicea* which were collected from several localities on the Balkan Peninsula. Our research was focused on the methanol extracts and essential oils of needles and cones, which were subjected to chemical analysis, as well as different biochemical and biological tests (antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial).

The content of 44 phenolics was determined by LC-MS/MS, which showed noticeable qualitative and quantitative differences between the species. The most abundant phenolics were catechin, rutin, quercitrin and epicatechin. These compounds were present in higher concentration in needle extracts than in cone extracts of the same species. Additionally, most results were the first verification of the presence of examined phenolics in *Juniperus* species and can be used as a chemotaxonomic marker. Chemical composition of essential oils was determined by GC-MS. Results have shown the presence of 77 terpenoids, with monoterpenoids (α -pinene, sabinen, β -myrcene, limonene and terpinen-4-ol) and sesquiterpenoids (germacren D) being most abundant. These results show that investigated essential oils of *Juniperus* species have simple terpenoid composition and that terpenoids can be used as chemotaxonomic markers with precaution, as ecological factors can strongly influence the terpenoid profile. However, according to the phenolic and terpenoid characterisation of the examined *Juniperus* species, they could be regarded as a possible new potent source of natural products.

Antioxidant activity of extracts and essential oils (radical scavenger capacity, reduction potential and inhibition of lipid peroxidation) was examined by spectrophotometric methods. In all of the tests examined plant substrates have shown a potent antioxidant activity in comparison with well-known synthetic antioxidants. To evaluate anti-inflammatory activity an *ex vivo* test for determination of inhibition of production of cyclooxygenase-1 (COX-1) and 12-lipoxygenase (12-LOX) metabolites was undertaken. The intact cell system (platelets) was used as a source of COX-1 and 12-LOX enzymes and the highly sensitive and specific

LC–MS/MS technique was used for detection of arachidonic acid metabolites (TXB₂, PGE₂, 12-HHT and 12-HETE) formed by COX-1 and 12-LOX. Determined activities confirmed the application of *Juniperus* species as anti-inflammatory agents, especially essential oils which showed great anti-inflammatory potency. Antimicrobial activity of essential oils was determined on two Gram positive (*S. aureus* and *C. perfringens*) and four Gram negative (*A. baumannii*, *E. coli*, *S. enteritidis* and *P. aeruginosa*) bacteria. The results indicate that *Juniperus* species, mainly their needles, are potent antimicrobial agents particularly against *S. aureus*, *C. perfringens* and *A. baumannii*.

Considering antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial potential, overall activity of *Juniperus* species can be ranged as follows: *J. sabina* > *J. foetidissima* > *J. communis* > *J. excelsa* > *J. phoenicea* > *J. macrocarpa* > *J. oxycedrus* > *J. sibirica*. These results undoubtedly validate the common use of *J. communis* and *J. oxycedrus* in traditional and official medicine and as a food supplement, and also indicate significant biological activity of other examined species, particularly *J. foetidissima* and *J. excelsa*, as well as their potential appliance as remedies and a potent source of natural products.

7. LITERATURA

- Abascal, K., Yarnell, E. (2008): Botanical Medicine for Cystitis. *Alternative and Complementary Therapies*. **14**: 69-77.
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. (2006): *Osnovna imunologija*. Data Status, Beograd, Republika Srbija.
- Abe, S., Maruyama, N., Hayama, K., Ishibashi, H., Inoue, S., Oshima, H., Yamaguchi, H. (2003): Suppression of tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil adherence responses by essential oils. *Mediators of Inflammation*. **12**: 323-328.
- Abul'saeva, S. A., Pashinina, L. T. (1982): Flavonoids of the needles of *Juniperus sabina*. *Chemistry of Natural Compounds*. **17**: 590.
- Achak, N., Romane, A. (2009): Chemical Studies of Leaf Essential Oils of Three Species of *Juniperus* From Tensift Al Haouz-Marrakech Region (Morocco). *Journal of Essential Oil Research*. **21**: 337-341.
- Adams, R. P. (1998): The leaf essential oils and chemotaxonomy of *Juniperus* sect. *Juniperus*. *Biochemical Systematics and Ecology*. **26**: 637-645.
- Adams, R. P. (1999): Systematics of multi-seeded eastern hemisphere *Juniperus* based on leaf essential oils and RAPD DNA fingerprinting. *Biochemical Systematics and Ecology*. **27**: 709-725.
- Adams, R. P. (2000a): Systematics of smooth leaf margin *Juniperus* of the western hemisphere based on leaf essential oils and RAPD DNA fingerprinting. *Biochemical Systematics and Ecology*. **28**: 149-162.
- Adams, R. P. (2000b): The serrate leaf margined *Juniperus* (Section *Sabina*) of the western hemisphere: systematics and evolution based on leaf essential oils and Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs). *Biochemical Systematics and Ecology*. **28**: 975-989.
- Adams, R. P. (2001): *Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectrometry*. Allured Publishing Corporation, Illinois, USA.
- Adams, R. P. (2004): The co-occurrence and systematic significance of pregeijerene B and 8-alpha-acetoxylemol in *Juniperus*. *Biochemical Systematics and Ecology*. **32**: 559-563.
- Adams, R. P. (2008): *Juniperus of the World: The genus Juniperus* 2nd edition. Trafford Publishing Co., Vancouver, Canada.
- Adams, R. P., Barrero, A. F., Lara, A (1996): Comparisons of the Leaf Essential Oils of *Juniperus phoenicea*, *J. phoenicea* subsp. *eu-mediterranea* Lebr. & Thiv. and *J. phoenicea* var. *turbinata* (Guss.) Parl. *Journal of Essential Oil Research*. **8**: 367-371.
- Adams, R. P., Beauchamp, P. S., Dev, V., Bathala, R. M. (2010): The Leaf Essential Oils of *Juniperus communis* L. Varieties in North America and the NMR and MS Data for Isoabienol. *Journal of Essential Oil Research*. **22**: 23-28.
- Adams, R. P., Demeke, T. (1993): Systematic relationships in *Juniperus* based on random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). *Taxon*. **42**: 553-571.
- Adams, R. P., Morris J. A., Schwarzbach, A. E. (2008): The evolution of Caribbean *Juniperus* (Cupressaceae): terpenoids, RAPDs, and DNA SNPs data. *Phytologia*. **90**: 103-120.
- Adams, R. P., Schwarzbach A. E., Pandey, R. N. (2003): The concordance of terpenoid, ISSR and RAPD markers, and ITS sequence data sets among genotypes: an example from *Juniperus*. *Biochemical Systematics and Ecology*. **31**: 375-387.
- Agarwal, V., Lal, P., Pruthi, V. (2010): Effect of Plant Oils on *Candida albicans*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. **43**: 447-451.

- Agelet, A., Vallès, J. (2003): Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Pallars (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). Part II. New or very rare uses of previously known medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **84**: 211-227.
- Agrawal, O. P., Bharadwaj, S., Mathur, R. (1980): Antifertility Effects of Fruit of *Juniperus communis*. *Planta Medica*. **40**: 98-101.
- Akkol, E. K., Güvenç, A., Yeşilada, E. (2009): A comparative study on the antinociceptive and anti-inflammatory activities of five *Juniperus* taxa. *Journal of Ethnopharmacology*. **125**: 330-336.
- Al-Mustafa, A. H., Al-Thunibat, O. Y. (2008): Antioxidant Activity of Some Jordanian Medicinal Plants Used Traditionally for Treatment of Diabetes. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. **11**: 351-358.
- Al-Qura'n, S. (2005): Ethnobotanical survey of folk toxic plants in southern part of Jordan. *Toxicon*. **46**: 119-129.
- Alviano, D. S., Alviano, C. S. (2009): Plant Extracts: Search for New Alternatives to Treat Microbial Diseases. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. **10**: 106-121.
- Angioni, A., Barra, A., Russo, M. T., Coroneo, V., Dessì, S., Cabras, P. (2003): Chemical Composition of the Essential Oils of *Juniperus* from Ripe and Unripe Berries and Leaves and Their Antimicrobial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**: 3073-3078.
- Antón, R., Camacho, M., Puig, L., Vila, L. (2002): Hepoxilin B₃ and its Enzymatically Formed Derivative Trioxilin B₃ are Incorporated into Phospholipids in Psoriatic Lesions. *The Journal of Investigative Dermatology*. **118**: 139-146.
- Auclair, S., Milenkovic, D., Besson, C., Chauvet, S., Gueux, E., Morand, C., Mazur, A., Scalbert, A. (2009): Catechin reduces atherosclerotic lesion development in apo E-deficient mice: A transcriptomic study. *Atherosclerosis*. **204**: e21-e27.
- Ayachi, A., Alloui, N., Bennoune, O., Yakhlef, G., Amiour, S. D., Bouzid, W., Zoughlache, S. D., Boudjellal, K., Abdessemed, H. (2009): Antibacterial Activity of Some Fruits; Berries and Medicinal Herb Extracts Against Poultry Strains of *Salmonella*. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*. **6**: 12-15.
- Baldea, L. A. N., Martineau, L. C., Benhaddou-Andaloussi, A., Arnason, J. T., Lévy, E., Haddad, P. S. (2010): Inhibition of intestinal glucose absorption by anti-diabetic medicinal plants derived from the James Bay Cree traditional pharmacopeia. *Journal of Ethnopharmacology*. **132**: 473-482.
- Ballerio, M., Poli, F., Sacchetti, G., Loi, M. C. (2001): Ethnobotanical research in the territory of Fluminimaggiore (south-western Sardinia). *Fitoterapia*. **72**: 788-801.
- Barjaktarović, B., Sovilj, M., Knez, Ž. (2005): Chemical Composition of *Juniperus communis* L. fruits supercritical CO₂ Extracts: Dependence on Pressure and Extraction Time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**: 2630-2636.
- Barnes, P. J. (1998): Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical Science*. **94**: 557-572.
- Barnes, S., Prasain, J. (2005): Current progress in the use of traditional medicines and nutraceuticals. *Current Opinion in Plant Biology*. **8**: 324-328.
- Beara, I. (2010): Fitohemijski skrining i procena antioksidantnog i antiinflamatornog potencijala sekundarnih biomolekula u vrstama roda *Plantago* L. *Doktorska disertacija*, Novi Sad, Republika Srbija.
- Beara, I., Orčić, D., Lesjak, M., Mimica-Dukić, N., Peković, B., Popović, M. (2010): Liquid chromatography/tandem mass spectrometry study of anti-inflammatory activity of Plantain (*Plantago* L.) species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **52**: 701-706.

- Bello, R., Moreno, L., Beltrán, B., Primo-Yúfera, E., Esplugues, J. (1997): Effects on Arterial Blood Pressure of Methanol and Dichloromethanol Extracts from *Juniperus oxycedrus* L. *Phytotherapy Research*. **11**: 161-162.
- Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996): The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*. **239**: 70-76.
- Bergonzelli, G. E., Donnicola, D., Porta, N., Corthésy-Theulaz, I. E. (2003): Essential Oils as Components of a Diet-Based Approach to Management of *Helicobacter* Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **47**: 3240-3246.
- Bernstein, P. R. (1998): Chemistry and Structure-Activity Relationships of Leukotriene Receptor Antagonists. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **157**: S220-S226.
- Bonet, M. A., Parada, M., Selga, A., Vallès, J. (1999): Studies on pharmaceutical ethnobotany in the regions of L'Alt Empordà and Les Guilleries (Catalonia, Iberian Peninsula). *Journal of Ethnopharmacology*. **68**: 145-168.
- Boti, J. B., Bighelli, A., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., Casanova, J. (2006): Chemical variability of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* berry and leaf oils from Corsica, analysed by combination of GC, GC-MS and ¹³C-NMR. *Flavour and Fragrance Journal*. **21**: 268-273.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Jovin, E. (2007): Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **55**: 7879-7885.
- Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T., Garrity, G. M. (2005): *Bergey's Manual*[®] of *Systematic Bacteriology* 2nd edition, Volume Two, *The Proteobacteria*, Part B *The Gammaproteobacteria*. Springer.
- Burt, S. (2004): Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*. **94**: 223-253.
- Cadenas, E., Davies, K. J. A. (2000): Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radical Biology and Medicine*. **29**: 222-230.
- Camuesco, D., Comalada, M., Concha, A., Nieto, A., Sierra, S., Xaus, J., Zarzuelo, A., Gálvez, J. (2006): Intestinal anti-inflammatory activity of combined quercitrin and dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, in rats with DSS-induced colitis. *Clinical Nutrition*. **25**: 466-476.
- Catella, F., Lawson, J. A., Fitzgerald D. J., Fitzgerald G. A. (1990): Endogenous biosynthesis of arachidonic acid epoxides in humans: increased formation in pregnancy-induced hypertension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **87**: 5893-5897.
- Cavaleiro, C., Pinto, E., Gonçalves, M. J., Salgueiro, L. (2006): Antifungal activity of *Juniperus* essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. *Journal of Applied Microbiology*. **100**: 1333-1338.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H., Chern, J. (2002): Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. **10**: 178-182.
- Charlier, C., Michaux, C. (2003): Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **38**: 645-659.
- Chatterjee, T., Ghosh, C., Roychoudhuri, P (1991): Antiinflammatory and Anti-pyretic Action of *Juniperus communis* (Linn.) Leaf Extract in Rats. *Indian Drugs*. **28**: 430-437.

- Chatzopoulou, P. S., Katsiotis, S. T. (1993): Chemical Investigation of the Leaf Oil of *Juniperus communis* L. *Journal of Essential Oil Research*. **5**: 603-607.
- Chatzopoulou, P. S., Katsiotis, S. T. (2006): Headspace analysis of the volatile constituents from *Juniperus communis* L. 'berries' (cones) grown wild in Greece. *Flavour and Fragrance Journal*. **21**: 492-496.
- Chavali, S. R., Weeks, C. E., Zhong, W. W., Forse, R. A. (1998): Increased production of TNF- α and decreased levels of dienoic eicosanoids, IL-6 and IL-10 in mice fed menhaden oil and juniper oil diets in response to an intraperitoneal lethal dose of LPS. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. **59**: 89-93.
- Comte, G., Allais, D. P., Simon, A., Es-Saady, D., Chulia, A. J., Delage, C., Saux, M. (1995): Crystal structure of sandaracopimaric acid, a lipoxygenase inhibitor from *Juniperus phoenicea*. *Journal of Natural Products*. **58**: 239-243.
- Comte, G., Vercauteren, J., Chulia, A. J., Allais, D. P., Delage, C. (1997): Phenylpropanoids from leaves of *Juniperus phoenicea*. *Phytochemistry*. **45**: 1679-1682.
- Curtis, C. L., Hughes, C. E., Flannery, C. R., Little, C. B., Harwood, J. L., Caterson, B. (2000): *n*-3 Fatty Acids Specifically Modulate Catabolic Factors Involved in Articular Cartilage Degradation. *The Journal of Biological Chemistry*. **275**: 721-724.
- Curtis-Prior, P. (2004): *The Eicosanoids*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.
- Damjanovic, B. M., Skala, D., Djakov-Petrovic, D., Baras, J. (2003): A Comparison between the Oil, Hexane Extract and Supercritical Carbon Dioxide Extract of *Juniperus communis* L. *The Journal of Essential Oil Research*. **15**: 90-92.
- Damjanović, B., Skala, D., Baras, J., Petrović-Djakov, D. (2006): Isolation of essential oil and supercritical carbon dioxide extract of *Juniperus communis* L. fruits from Montenegro. *Flavour and Fragrance Journal*. **21**: 875-880.
- de Pascual, J., Feliciano, A. S., Miguel del Corral, J. M., Barrero, A. F., Rubio, M., Muriel, L. (1981): 2,5-dimethylcoumarins from leaves of *Juniperus sabina*. *Phytochemistry*. **20**: 2778-2779.
- Delamare, A. P. L., Moschen-Pistorello, I. T., Artico, L., Atti-Serafini, L., Echeverrigaray, S. (2007): Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry*. **100**: 603-608.
- Dernbach, E., Urbich, C., Brandes, R. P., Hofmann, W. K., Zeiher, A. M., Dimmeler, S. (2004): Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress. *Blood*. **104**: 3591-3597.
- Derwich, E., Benziane, Z., Boukir, A. (2010a): Chemical Composition of Leaf Essential Oil of *Juniperus phoenicea* and Evaluation of its Antibacterial Activity. *International Journal of Agriculture & Biology*. **12**: 199-204.
- Derwich, E., Benziane, Z., Chabir, R. (2011): Aromatic and medicinal plants of Morocco: chemical composition of essential oils of *Rosmarinus officinalis* and *Juniperus phoenicea*. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. **2**: 145-153.
- Derwich, E., Benziane, Z., Taouil, R., Senhaji, O., Tazani, M. (2010b): A Comparative Study of the Chemical Composition of the Leaves Volatile Oil of *Juniperus phoenicea* and *Juniperus oxycedrus*. *Middle-East Journal of Scientific Research*. **5**: 416-424.
- Ding, X., Hennig, R., Adrian, T. E. (2003): Lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism: new insights in treatment and chemoprevention of pancreatic cancer. *Molecular Cancer*. **2**: 10.
- Dob, T., Dahmane, D., Chelghoum, C. (2006): Essential Oil Composition of *Juniperus oxycedrus* Growing in Algeria. *Pharmaceutical Biology*. **44**: 1-6.

- Elmastaş, M., Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu, Ö. İ., Aboul-Enein, H. Y. (2006): A study on the In Vitro Antioxidant Activity of Juniper (*Juniperus communis* L.) Fruit Extracts. *Analytical Letters*. **39**: 47-65.
- El-Sawi, S. A., Motawae, H. M., Ali, A. M. (2007): Chemical composition, cytotoxic activity and antimicrobial activity of essential oils of leaves and berries of *Juniperus phoenicea* L. grown in Egypt. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines*. **4**: 417-426.
- El-Sayed, A. M. (1998): Diterpene constituents of *Juniperus polycarpus* and their antimicrobial and anti-inflammatory activities. *Zagazig Journal of Pharmaceutical Sciences*. **7**: 80-86.
- Emami, S. A., Asili, J., Mohagheghi, Z., Hassanzadeh, M. K. (2007): Antioxidant activity of Leaves and Fruits of Iranian Conifers. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. **4**: 313-319.
- Ennajar, M., Bouajila, J., Lebrihi, A., Mathieu, F., Abderraba, M., Raies, A., Romdhane, M. (2009): Chemical Composition and Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils and Various Extracts of *Juniperus phoenicea* L. (Cupressaceae). *Journal of Food Science*. **74**: 364-371.
- Espin, J. C., Soler-Rivas, C., Wichers, H. J. (2000): Characterization of the Total Free Radical Scavenger Capacity of Vegetable Oils and Oil Fractions Using 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **48**: 648-656.
- Feliciano, A. S., Miguel del Corral, J. M., Gordaliza, M., Castro, A. (1990): Lignans from *Juniperus sabina*. *Phytochemistry*. **29**: 1335-1338.
- Filipowicz, N., Kamiński, M., Kurlenda, J., Asztemborska, M., Ochocka, J. R. (2003): Antibacterial and Antifungal Activity of Juniper Berry Oil and its Selected Components. *Phytotherapy Research*. **17**: 227-231.
- Finkel, T. (2005): Radical medicine: treating ageing to cure disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **6**: 971-976.
- Folco, G., Murphy, R. C. (2006): Eicosanoid Transcellular Biosynthesis: From Cell-Cell Interactions to in Vivo Tissue Responses. *Pharmacological Reviews*. **58**: 375-388.
- Frutos, P., Hervás, G., Ramos, G., Giráldez, F. J., Mantecón, A. R. (2002): Condensed tannin content of several shrub species from a mountain area in northern Spain, and its relationship to various indicators of nutritive value. *Animal Feed Science and Technology*. **95**: 215-226.
- Fujita, T., Sezik, E., Tabata, M., Yeşilada, E., Honda, G., Takeda, Y., Tanaka, T., Takaishi, Y. (1995): Traditional Medicine in Turkey VII. Folk Medicine in Middle and West Black Sea Regions. *Economic Botany*. **49**: 406-422.
- Gaddi, A., Cicero, A. F. G., Pedro, E. J. (2004): Clinical perspectives of anti-inflammatory therapy in the elderly: the lipoxigenase (LOX)/cyclooxygenase (COX) inhibition concept. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. **38**: 201-212.
- Gallagher, A. M., Flatt, P. R., Duffy, G., Abdel-Wahab, Y. H. A. (2003): The effects of traditional antidiabetic plants on *in vitro* glucose diffusion. *Nutrition Research*. **23**: 413-424.
- Gao, R., Gao, C., Tian, X., Yu, X., Di, X., Xiao, H., Zhang, X. (2004): Insecticidal activity of deoxypodophyllotoxin, isolated from *Juniperus sabina* L, and related lignans against larvae of *Pieris rapae* L. *Pest Management Science*. **60**: 1131-1136.
- Garboui, S. S., Borg-Karlson, A. K., Pålsson, K. (2009): Tick Repellent Properties of Three Libyan Plants. *Journal of Medical Entomology*. **46**: 1415-1419.
- Gautam, R., Saklani, A., Jachak, S. M. (2007): Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents. *Journal of Ethnopharmacology*. **110**: 200-234.

- Gavini, E., Sanna, V., Sharma, R., Juliano, C., Usai, M., Marchetti, M., Karlsen, J., Giunchedi, P. (2005): Solid Lipid Microparticles (SLM) Containing Juniper Oil as Anti-Acne Topical Carriers: Preliminary Studies. *Pharmaceutical Development and Technology*. **10**: 479-487.
- Glišić, S. B., Milojević, S. Ž., Dimitrijević, S. I., Orlović, A. M., Skala, D. U. (2007): Antimicrobial activity of the essential oil and different fractions of *Juniperus communis* L. and a comparison with some commercial antibiotics. *Journal of Serbian Chemical Society*. **72**: 311-320.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R. (1982): Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*. **126**: 131-138.
- Greer, D., Pfahl, L., Rieck, J., Daniels, T., Garza, O. (2008): Comparison of a Novel Distillation Method versus a Traditional Distillation Method in a Model Gin System Using Liquid/Liquid Extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**: 9030-9036.
- Greer, M. R. J., Cates, R. G., Johnson, F. B., Lamnaouer, D., Ohai, L. (2010): Activity of acetone and methanol extracts from thirty-one medicinal plant species against herpes simplex virus types 1 and 2. *Pharmaceutical Biology*. **48**: 1031-1037.
- Gresele, P., Deckmyn, H., Nenci, G. G., Vermynen, J. (1991): Thromboxane synthase inhibitors, thromboxane receptor antagonists and dual blockers in thrombotic disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*. **12**: 158-163.
- Griffoni, C., Spisni, E., Strillacci, A., Toni, M., Bachschmid, M. M., Tomasi, V. (2007): Selective inhibition of prostacyclin synthase activity by rofecoxib. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. **11**: 327-338.
- Guarrera, P. M. (2003): Food medicine and minor nourishment in the folk traditions of Central Italy (Marche, Abruzzo and Latium). *Fitoterapia*. **74**: 515-544.
- Gutteridge, J. M. C. (1987): Ferrous-salt-promoted damage to deoxyribose and benzoate. The increased effectiveness of hydroxyl-radical scavengers in the presence of EDTA. *Biochemical Journal*. **243**: 709-714.
- Halliwell, B. (2006): Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic life. *Plant Physiology*. **141**: 312-322.
- Halliwell, B. (2009): The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology & Medicine*. **46**: 531-542.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1986): Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine-some problems and concepts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **46**: 501-514.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (2007): *Free radicals in biology and medicine* 4th edition. Oxford University Press Inc, New York, USA.
- Hambeng, M., Svensson, J., Samuelsson, B. (1974): Prostaglandin Endoperoxides. A New Concept Concerning the Mode of Action and Release of Prostaglandins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **71**: 3824-3828.
- Hammami, R., Zouhir, A., Hamida, J. B., Neffati, M., Vergoten, G., Naghmouchi, K., Fliss, I. (2009): Antimicrobial properties of aqueous extracts from three medicinal plants growing wild in arid regions of Tunisia. *Pharmaceutical Biology*. **47**: 452-457.
- Hammarström, S. (1983): Stereospecific Elimination of Hydrogen at C-10 in Eicosapentaenoic Acid during the Conversion to Leukotriene C₅. *The Journal of Biological Chemistry*. **258**: 1427-1430.
- Hamyl (2009): *Larousse Gastronomique*. Octopus Publishing Group, London, UK.

- Harbilas, D., Martineau, L. C., Harris, C. S., Adeyiwola-Spoor, D. C. A., Saleem, A., Lambert, J., Caves, D., Johns, T., Prentki, M., Cuerrier, A., Arnason, J. T., Bennett, S. A. L., Haddad, P. S. (2009): Evaluation of the antidiabetic potential of selected medicinal plant extracts from the Canadian boreal forest used to treat symptoms of diabetes: part II. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. **87**: 479-492.
- Hartwell, J. L., Johnson, J. M., Fitzgerald, D. B., Belkin, M. (1953): Podophyllotoxin from *Juniperus* Species; Savinin. *Journal of the American Chemical Society*. **75**: 235-236.
- Hayley, L. A., Palombo, E. A. (2009): Activity of Essential Oils Against *Bacillus subtilis* Spores. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. **19**: 1590-1595.
- Hayouni, E. A., Abedrabba, M., Bouix, M., Hamdi, M. (2007): The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*. **105**: 1126-1134.
- Hecker, M., Ullrich, V. (1989): On the Mechanism of Prostacyclin and Thromboxane A₂ Biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*. **264**: 141-150.
- Hernandez, E. G., Martinez, M. D. C. L., Villanova, R. G. (1987): Determination by gas chromatography of terpenes in the berries of the species *Juniperus oxycedrus* L., *J. thurifera* L. and *J. sabina* L. *Journal of Chromatography A*. **396**: 416-420.
- Hiltunen, R., Laakso, I. (1995): Gas Chromatographic Analysis and Biogenetic Relationships of Monoterpene Enantiomers in Scots Pine and Juniper Needle Oils. *Flavour and Fragrance Journal*. **10**: 203-210.
- Hinneburg, I., Dorman, H. J. D., Hiltunen, R. (2006): Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry*. **97**: 122-129.
- Honda, G., Yeşilada, E., Tabata, M., Sezik, E., Fujita, T., Takeda, Y., Takaishi, Y., Tanaka, T. (1996): Traditional medicine in Turkey. VI. Folk medicine in West Anatolia: Afyon, Kütahya, Denizli, Muğla, Aydın provinces. *Journal of Ethnopharmacology*. **53**: 75-87.
- http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Juniperus_communis_communis_Italy.jpg
- <http://cuadernodelcampo.blogspot.com/2011/02/visu-de-coniferas.html>
- <http://ies-perevives.xtec.net/ernestfabregat/Botanica/plantes/Cupressaceae/Juniperus%20oxycedrus.htm>
- http://laspi.russian-women.net/big/laspi_07358.shtml
- http://www.carlroth.com/media/_en-de/Graphics/00001910_0.jpg
- <http://www.photographersdirect.com/buyers/stockphoto.asp?imageid=1473729>
- <http://www.pinetum.org/cones/JUcones.htm>
- <http://www.rusbiophoto.com/images/pages/03006182.jpg>
- Iacovacci, P., Afferni, C., Barletta, B., Tinghino, R., Di Felice, G., Pini, C., Mari, A. (1998): *Juniperus oxycedrus*: A new allergenic pollen from the Cupressaceae family. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **101**: 755-761.
- Idolo, M., Motti, R., Mazzoleni, S. (2010): Ethnobotanical and phytomedicinal knowledge in a long-history protected area, the Abruzzo, Lazio and Molise National Park (Italian Apennines). *Journal of Ethnopharmacology*. **127**: 379-395.
- Iida, N., Inatomi, Y., Murata, H., Murata, J., Lang, F. A., Tanaka, T., Nakanishi, T., Inada, A. (2010): New Phenylpropanoid Glycosides from *Juniperus communis* var. *depressa*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. **58**: 742-746.
- Iizuka, K., Akahane, K., Momose, D., Nakazawa, M., Tanouchi, T., Kawamura, M., Ohyama, I., Kajiwarra, I., Iguchi Y., Okada, T., Taniguchi, K., Miyamoto, T., Hayashi,

- M. (1981): Highly Selective Inhibitors of Thromboxane Synthetase. 1. Imidazole Derivatives. *The Journal of Medicinal Chemistry*. **24**: 1139–1148.
- Innocenti, M., Michelozzi, M., Giaccherini, C., Ieri, F., Vincieri, F. F., Mulinacci, N. (2007): Flavonoids and Biflavonoids in Tuscan Berries of *Juniperus communis* L.: Detection and Quantitation by HPLC/DAD/ESI/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **55**: 6596-6602.
- Ishitsuka, Y., Moriuchi, H., Isohama, Y., Tokunaga, H., Hatamoto, K., Kurita, S., Irikura, M., Iyama, K., Irie, T. (2009): A Selective thromboxane A₂ (TXA₂) Synthase Inhibitor, Ozagrel, Attenuates Lung Injury and Decreases Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Interleukin-8 mRNA Expression in Oleic Acid-Induced Lung Injury in Guinea Pigs. *Journal of Pharmacological Sciences*. **111**: 211-215.
- Izzo, A. A., Di Carlo, G., Biscardi, D., De Fusco, R., Mascolo, N., Borrelli, F., Capasso, F., Fasulo, M. P., Autore, G. (1995): Biological Screening of Italian Medicinal Plants for Antibacterial Activity. *Phytotherapy Research*. **9**: 281-286.
- Jachak, S. M. (2007): PGE synthase inhibitors as an alternative to COX-2 inhibitors. *Current Opinion in Investigational Drugs*. **8**: 411-415.
- Jang, M., Pezzuto J. M. (1998): Effects of resveratrol on 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced oxidative events and gene expression in mouse skin. *Cancer Letters*. **134**: 81-89.
- Jimenez-Arellanes, A., Meckes, M., Ramirez, R., Torres, J., Luna-Herrera, J. (2003): Activity against Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican Plants Used to Treat Respiratory Diseases. *Phytotherapy Research*. **17**: 903-908.
- Johnson, L. M. (2006): Gitksan medicinal plants-cultural choice and efficacy. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. **2**: 29.
- Jones, S. M., Zhong, Z., Enomoto, N., Schemmer, P., Thurman, R. G. (1998): Dietary Juniper Berry Oil Minimizes Hepatic Reperfusion Injury in the Rat. *Hepatology*. **28**: 1042-1050.
- Jordan, V. C., Castracane, V. D. (1976): The effect of reported prostaglandin synthetase inhibitors on estradiol - stimulated uterine prostaglandin biosynthesis *in vivo* in the ovariectomized rat. *Prostaglandins*. **12**: 1073-1081.
- Jovanović, B. (1992): *Juniperus* L. U Sarić M. R. *Flora Srbije* Vol. 1. Srpska akademija nauka i umetnosti, Beograd, SRJ.
- Ju, J. B., Kim, J. S., Choi, C. W., Lee, H. K., Oh, T. K., Kim, S.C. (2008): Comparison between ethanolic and aqueous extracts from Chinese juniper berries for hypoglycaemic and hypolipidemic effects in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. **115**: 110-115.
- Kallio, H., Jünger-Mannermaa, K. (1989): Maritime Influence on the Volatile Terpenes in the Berries of Different Ecotypes of Juniper (*Juniperus communis* L.) in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **37**: 1013-1016.
- Kantarci, A., Van Dyke, T. E. (2003): Lipoxins in Chronic Inflammation. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. **14**: 4-12.
- Karlsen, J., Svendsen, B. A. (2002): The influence of the isolation method on the composition of the essential oil of leaves and twigs of *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. growing in Norway. *Scientia Pharmaceutica*. **70**: 87-92.
- Kepes, J. J., Kepes, M. (1969): Predominantly Cerebral Forms of Histiocytosis-X. *Acta Neuropathologica*. **14**: 77-98.
- Kilic, A., Hafizoglu, H., Tümen, I., Dönmez, I. E., Sivrikaya, H., Hemming, J. (2011): Phenolic extractives of cones and berries from Turkish coniferous species. *European Journal of Wood and Wood Products*. **69**: 63-66.

- Kim, H. Y., Kang, M. H. (2005): Screening of Korean Medicinal Plants for Lipase Inhibitory Activity. *Phytotherapy Research*. **19**: 359-361.
- Kim, S. J., Jung, J. Y., Kim, H. W., Park, T. (2008): Anti-obesity effects of *Juniperus chinensis* extract are associated with increased AMP-activated protein kinase expression and phosphorylation in the visceral adipose tissue of rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **31**: 1415-1421.
- Kırca, A., Arslan, E. (2008): Antioxidant capacity and total phenolic content of selected plants from Turkey. *International Journal of Food Science and Technology*. **43**: 2038-2046.
- Knezevic, P., Petrovic, O. (2008): Antibiotic resistance of commensal *Escherichia coli* of food-producing animals from three Vojvodinian farms, Serbia. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **31**: 360-363.
- Kontogiorgis, C., Hadjipavlou-Litina, D. (2010): Thromboxane Synthase Inhibitors and Thromboxane A₂ Receptor Antagonists: A Quantitative Structure Activity Relationships (QSARs) Analysis. *Current Medicine Chemistry*. **17**: 3162-3214.
- Koračević, D., Bjelaković, G., Đorđević, V., Nikolić, J., Pavlović D., Kocić, G. (1996): *Biohemija*. Savremena administracija, Beograd, Jugoslavija.
- Kozan, E., Küpeli, E., Yeşilada, E. (2006): Evaluation of some plants used in Turkish folk medicine against parasitic infections for their in vivo anthelmintic activity. *Journal of Ethnopharmacology*. **108**: 211-216.
- Kunwar, R. M., Nepal, B. K., Kshhetri, H. B., Rai, S. K., Bussmann, R. W. (2006): Ethnomedicine in Himalaya: a case study from Dolpa, Humla, Jumla and Mustang districts of Nepal. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. **2**: 27.
- Kusari, S., Lamshöft, M., Spiteller, M. (2009): *Aspergillus fumigatus* Fresenius, an endophytic fungus from *Juniperus communis* L. Horstmann as a novel source of the anticancer pro-drug deoxypodophyllotoxin. *Journal of Applied Microbiology*. **107**: 1019-1030.
- Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve P. (2007.): Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*. **46**: 244-282.
- Lahlou, M. (2004): Methods to Study the Phytochemistry and Bioactivity of Essential Oils. *Phytotherapy Research*. **18**: 435-448.
- Lans, C., Turner, N., Khan, T. (2008): Medicinal plant treatments for fleas and ear problems of cats and dogs in British Columbia, Canada. *Parasitology Research*. **103**: 889-898.
- Lans, C., Turner, N., Khan, T., Brauer, G., Boepple, W. (2007): Ethnoveterinary medicines used for ruminants in British Columbia, Canada. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. **3**: 11.
- Lantto, T. A., Colucci, M., Zavadová, V., Hiltunen, R., Raasmaja, A. (2009): Cytotoxicity of curcumin, resveratrol and plant extracts from basil, juniper, laurel and parsley in SH-SY5Y and CV1-P cells. *Food Chemistry*. **117**: 405-411.
- Lascaratos, J., Tsiamis, C., Lascaratos, G., Stavrianeas, N. G. (2004): The roots of cosmetic medicine: hair cosmetics in Byzantine times (AD 324-1453). *International Journal of Dermatology*. **43**: 397-401.
- Lautié, E., Fliniaux, M., Villarreal, M. L. (2010): Updated biotechnological approaches developed for 2,7'-cyclo lignan production. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. **55**: 139-153.
- Lesjak, M., Beara, I., Orčić, D., Anačkov, G., Balog, K., Francišković, M., Mimica-Dukić, N. (2011): *Juniperus sibirica* Burgsdorf. as a novel source of antioxidant and anti-inflammatory agents. *Food Chemistry*. **124**: 850-856.

- Leslie, C.C. (1997): Properties and Regulation of Cytosolic Phospholipase A₂. *The Journal of Biological Chemistry*. **272**: 16709-16712.
- Leung, A. Y., Foster, S. (1996): *Encyclopedia of Common Natural Ingredients*. Wiley, New York, US.
- Loi, M. C., Poli, F., Sacchetti, G., Selenu, M. B., Ballero, M. (2004): Ethnopharmacology of Ogliastra (Villagrande Strisaili, Sardinia, Italy). *Fitoterapia*. **75**: 277-295.
- Loizzo, M. R., Tundis, R., Conforti, F., Saab, A. M., Statti, G. A. Menichini, F. (2007): Comparative chemical composition, antioxidant and hypoglycaemic activities of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* L. berry and wood oils from Lebanon. *Food Chemistry*. **105**: 572-578.
- Łuczaj, L., Szymański, W. M. (2007): Wild vascular plants gathered for consumption in the Polish countryside: a review. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. **3**: 17.
- Maatooq, G. T., El-Sharkawy, S. H., Afifi, M. S., Rosazza, J. P. N. (1998): Flavonoids from two Cupressaceae Plants. *Natural Product Sciences*. **4**: 9-14.
- MacDonald-Wicks, L. K., Wood, L. G., Garg, M. L. (2006): Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **86**: 2046-2056.
- Machado, M., Santoro, G., Sousa, M. C., Salgueiro, L., Cavaleiro, C. (2010): Activity of essential oils on the growth of *Leishmania infantum* promastigotes. *Flavour and Fragrance Journal*. **25**: 156-160.
- MacMillan, N. (2010): *The Illustrated Cook's Book of Ingredients*. DK Publishing, London, UK.
- Madari, H., Jacobs, R. S. (2004): An Analysis of Cytotoxic Botanical Formulations Used in the Traditional Medicine of Ancient Persia as Abortifacients. *Journal of Natural Products*. **67**: 1204-1210.
- Mahady, G. B., Pendland, S. L., Stoia, A., Hamill, F. A., Fabricant, D., Dietz, B. M., Chadwick, L. R. (2005): *In Vitro* Susceptibility of *Helicobacter pylori* to Botanical Extracts used Traditionally for the Treatment of Gastrointestinal Disorders. *Phytotherapy Research*. **19**: 988-991.
- Mamedov, N., Gardner, Z., Craker, L. E. (2004): Medicinal Plants Used in Russia and Central Asia for the Treatment of Selected Skin Conditions. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*. **11**: 191-222.
- Marc, E. B., Nelly, A., Annick, D., Frederic, D. (2008): Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon. *Journal of Ethnopharmacology*. **120**: 315-334.
- Marks, F., Fürstenberg, G. (1999): Prostaglandins, Leukotrienes and Other Eicosanoids: From Biogenesis to Clinical Application. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Marnett, L. J., Rowlinson, S. W., Goodwin, D. C., Kalgutkar, A. S., Lanzo, C. A (1999): Arachidonic Acid Oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of Catalysis and Inhibition. *The Journal of Biological Chemistry*. **274**: 22903-22906.
- Marongiu, B., Porcedda, S., Caredda, A., De Gioannis, B., Vargiu, L., La Colla, P. (2003): Extraction of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* essential oil by supercritical carbon dioxide: influence of some process parameters and biological activity. *Flavour and Fragrance Journal*. **18**: 390-397.
- Martz, F., Peltola, R., Fontanay, S., Duval, R. E., Julkunen-Tiitto, R., Stark, S. (2009): Effect of Latitude and Altitude on the Terpenoid and Soluble Phenolic Composition of Juniper (*Juniperus communis*) Needles and Evaluation of Their Antibacterial Activity in the Boreal Zone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **57**: 9575-9584.

- Mastelić, J., Miloš, M., Kuštrak, D., Radonić, A. (2000): Essential Oil and Glycosidically Bound Volatile Compounds from the Needles of Common Juniper (*Juniperus communis* L.). *Croatica Chemica Acta*. **73**: 585-593.
- Mayes, P. A., Botham, K. M. (2003): *Metabolism of unsaturated fatty acids and eicosanoids*. In Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W. *Harper's Illustrated Biochemistry* 26th edition. Lange Medical Books/McGraw-Hill, Columbus, Ohio, USA.
- Mazari, K., Bendimerad, N., Bekhechi, C., Fernandez, X. (2010): Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian *Juniperus phoenicea* L. and *Cupressus sempervirens* L. *Journal of Medicinal Plants Research*. **4**: 959-964.
- Mazzio, E. A., Soliman, K. F. A. (2010): *In Vitro* Screening of Tumorcidal Properties of International Medicinal Herbs: Part II. *Phytotherapy Research*. **24**: 1813-1824.
- McCune, L. M., Johns, T. (2007): Antioxidant activity relates to plant part, life form and growing condition in some diabetes remedies. *Journal of Ethnopharmacology*. **112**: 461-469.
- Medini, H., Elaissi, A., Farhat, F., Khouja, M. L., Chemli, R., Harzallah-Skhiri, F. (2009): Seasonal and Geographical Influences on the Chemical Composition of *Juniperus phoenicea* L. Essential Oil Leaves from the Northern Tunisia. *Chemistry & Biodiversity*. **6**: 1378-1387.
- Medini, H., Elaissi, A., Khouja, M. L., Chraief, I., Farhat, F., Hammami, M., Chemli, R., Harzallah-Skhiri, F. (2010): Leaf Essential Oil of *Juniperus oxycedrus* L. (Cupressaceae) Harvested in Northern Tunisia: Composition and Intra-Specific Variability. *Chemistry & Biodiversity*. **7**: 1254-1266.
- Medini, H., Marzouki, H., Chemli, R., Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Tuveri, E. (2008): Chemical Characterization and Evaluation of Biological Activity of Essential Oil of *Juniperus phoenicea* of Tunisia. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*. **11**: 233-241.
- Meusinger, R. (2009): Spectroscopy challenge 14. *Analytical and bioanalytical chemistry*. **395**: 1185-1189.
- Miceli, N., Trovato, A., Dugo, P., Cacciola, F., Donato, P., Marino, A., Bellinghieri, V., La Barbera, T. M., Güveng, A., Taviano, M. F. (2009): Comparative Analysis of Flavonoid Profile, Antioxidant and Antimicrobial Activity of the Berries of *Juniperus communis* L. var. *communis* and *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **57**: 6570-6577.
- Milos, M., Radonic, A. (2000): Gas chromatography mass spectral analysis of free and glycosidically bound volatile compounds from *Juniperus oxycedrus* L. growing wild in Croatia. *Food Chemistry*. **68**: 333-338.
- Misharina, T. A., Terenina, M. B., Krikunova, N. I. (2009): Antioxidant Properties of Essential Oils. *Applied Biochemistry and Microbiology*. **45**: 642-647.
- Mišić, V. (1981): *Šumska vegetacija klisura i kanjona istočne Srbije*. Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Beograd, SFRJ.
- Moein, M. R., Ghasemi, Y., Moein, S., Nejati, M. (2010): Analysis of antimicrobial, antifungal and antioxidant activities of *Juniperus excelsa* M. B subsp. *Polycarpus* (K. Koch) Takhtajan essential oil. *Pharmacognosy Research*. **2**: 128-131.
- Moreno, L., Bello, R., Beltrán, B., Calatayud, S., Primo-Yúfera, E., Esplugues, J. (1998): Pharmacological Screening of Different *Juniperus oxycedrus* L. Extracts. *Pharmacology & Toxicology*. **82**: 108-112.
- Moreno, L., Bello, R., Primo-Yúfera, E., Esplugues, J. (1997): *In vitro* Studies of Methanol and Dichloromethanol Extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *Phytotherapy Research*. **11**: 309-311.

- Mossa, J. S., Muhammad, I., El-Feraly, F. S., Hupford, C. D. (1992): 3 β ,12-dihydroxyabieta-8,11,13-triene-1-one and other constituents from *Juniperus excelsa* leaves. *Phytochemistry*. **31**: 2789-2792.
- Moujir, L., Seca, A. M., Silva, A. M., Barreto, M. C. (2008): Cytotoxic activity of diterpenes and extracts of *Juniperus brevifolia*. *Planta Medica*. **74**: 751-753.
- Mrabet, A., Rejili, M., Lachiheb, B., Toivonen, P., Chaira, N., Ferchichi, A. (2008): Microbiological and chemical characterisations of organic and conventional date pastes (*Phoenix dactylifera* L.) from Tunisia. *Annals of Microbiology*. **58**: 453-459.
- Muhammad, I., Mossa, J. S., El-Feraly, F. S. (1992): Antibacterial Diterpenes from the Leaves and Seeds of *Juniperus excelsa* M. Bieb. *Phytotherapy Research*. **6**: 261-264.
- Muto, N., Tomokuni, T., Haramoto, M., Tatemoto, H., Nakanishi, T., Inatomi, Y., Murata, H., Akira, I. (2008): Isolation of Apoptosis- and Differentiation-Inducing Substances toward Human Promyelocytic Leukemia HL-60 Cells from Leaves of *Juniperus taxifolia*. *Biosciences, Biotechnology and Biochemistry*. **72**: 477-484.
- Mutoh, M., Takahashi, M., Fukuda, K., Matsushima-Hibiya, Y., Mutoh, H., Sugimura, T., Wakabayashi, K. (2000): Suppression of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells by chemopreventive agents with a resorcintype structure. *Carcinogenesis*. **21**: 959-963.
- Na, H., Koo, H., Lee, G., Yoo, S., Park, J., Lyu, Y., Kim, H. (2001): Juniper oil inhibits the heat shock-induced apoptosis via preventing the caspase-3 activation in human astrocytes CCF-STTG1 cells. *Clinica Chimica Acta*. **314**: 215-220.
- Nakanishi, T., Iida, N., Inatomi, Y., Murata, H., Inada, A., Murata, J., Lang, F. A., Inuma, M., Tanaka, T. (2004a): Neolignan and flavonoid glycosides in *Juniperus communis* var. *depressa*. *Phytochemistry*. **65**: 207-213.
- Nakanishi, T., Iida, N., Inatomi, Y., Murata, H., Inada, A., Murata, J., Lang, F. A., Inuma, M., Tanaka, T. (2004b): New Neolignan and Phenylpropanoid Glycosides in *Juniperus communis* var. *depressa*. *Heterocycles*. **63**: 2573-2580.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (1990): *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that grow Aerobically*. Approved standard M7-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Vilanova, PA.
- Nelson, R. R. (1997): In-vitro activities of five plant essential oils against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **40**: 305-306.
- Neves, Â., Rosa, S., Gonçalves, J., Rufino, A., Judas, F., Salgueiro, L., Lopes, M. C., Cavaleiro, C., Mendes, A. F. (2010): Screening of Five Essential Oils for Identification of Potential Inhibitors of IL-1-induced Nf- κ B Activation and NO Production in Human Chondrocytes: Characterization of the Inhibitory Activity of α -Pinene Authors. *Planta Medica*. **76**: 303-308.
- Nie, D., Honn, K. V. (2002): Cyclooxygenase, lipoxygenase and tumor angiogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **59**: 799-807.
- Nigam, S., Zefiriou, M., Deva, R., Ciccoli, R., Roux-Van der Merwe, R. (2007): Structure, biochemistry and biology of hepoxilins. An update. *The FEBS Journal*. **274**: 3503-3512.
- Nishikimi, M., Appaji, N., Yagi, K. (1972): The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **46**: 849-854.
- Ohno, T., Kita, M., Yamaoka, Y., Imamura, S., Yamamoto, T., Mitsufuji, S., Kodama, T., Kashima, K., Imanishi, J. (2003): Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. **8**: 207-215.

- Orav, A., Koel, M., Kailas, T., Müürisepp, M. (2010): Comparative analysis of the composition of essential oils and supercritical carbon dioxide extracts from the berries and needles of Estonian juniper (*Juniperus communis* L.). *Procedia Chemistry*. **2**: 161-167.
- Orhan, N., Berkkan, A., Orhan, D. D., Aslan, M., Ergun, F. (2011): Effects of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* on tissue lipid peroxidation, trace elements (Cu, Zn, Fe) and blood glucose levels in experimental diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*. **133**: 759-764.
- Ortholand, J. Y., Ganesan, A. (2004): Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. *Current Opinion in Chemical Biology*. **8**: 271-280.
- Pairet, M., Engelhardt, G. (1996): Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implication. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. **10**:1-17.
- Papież, M. A., Baran, J., Bukowska-Straková, K., Wiczowski, W. (2010): Antileukemic action of (-)-epicatechin in the spleen of rats with acute myeloid leukemia. *Food and Chemical Toxicology*. **48**: 3391-3397.
- Pavela, R. (2008): Insecticidal Properties of Several Essential Oils on the House Fly (*Musca domestica* L.). *Phytotherapy Research*. **22**: 274-278.
- Peters-Golden, M., Henderson, W. R. Jr. (2007): Leukotrienes. *The New England Journal of Medicine*. **357**: 1841-1854.
- Petlevski, R., Hadžija, M., Slijepčević, M., Juretić, D. (2001): Effect of 'antidiabetis' herbal preparation on serum glucose and fructosamine in NOD mice. *Journal of Ethnopharmacology*. **75**: 181-184.
- Petlevski, R., Hadžija, M., Slijepčević, M., Juretić, D., Petrik, J. (2003): Glutathione S-Transferases and Malondialdehyde in the Liver of NOD Mice on Short-Term Treatment with Plant Mixture Extract P-9801091. *Phytotherapy Research*. **17**: 311-314.
- Pieroni, A., Dibra, B., Grishaj, G., Grishaj, I., Maçai, S. G. (2005): Traditional phytotherapy of the Albanians of Lepushe, Northern Albanian Alps. *Fitoterapia*. **76**: 379-399.
- Pietta, P., Simonetti, P., Mauri, P. (1998): Antioxidant Activity of Selected Medical Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **46**: 4487-4490.
- Pitt, T. L., Simpson, A. J. H. (2006): *Pseudomonas and Burkholderia* spp. In Gillespie, S. H., Hawkey, P. M. *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. 2nd edition. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.
- Pourmortazavi, S. M., Baghaee, P., Mirhosseini, M. A. (2004): Extraction of volatile compounds from *Juniperus communis* L. leaves with supercritical fluid carbon dioxide: comparison with hydrodistillation. *Flavour and Fragrance Journal*. **19**: 417-420.
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., Ignacimuthu, S. (2006): *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **6**: 39.
- Pritz, R. K., Launchbaugh, K. L., Taylor, Jr. C. A. (1997): Effects of Breed and Dietary Experience on Juniper Consumption by Goats. *Journal of Range Management*. **50**: 600-606.
- Rajouani, N., Itto, M. Y. A., Benharref, A., Auhmania, A., Daran, J. (2008): 6-Hydroxy-7-isopropyl-1,1,4a-trimethyl-2,3,4,4a,10,10a-hexahydrophenanthren-9(1H)-one. *Acta Crystallographica Section E Structure Reports Online*. **64**: o762.
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Moore, P. K. (2004): *Farmakologija*. Data Status, Beograd, Republika Srbija.

- Reddy, S. T., Herschman, H. R. (1994): Ligand-induced Prostaglandin Synthesis Requires Expression of the TIS10/PGS-2 Prostaglandin Synthase Gene in Murine Fibroblasts and Macrophages. *The Journal of Biological Chemistr.* **269**: 15473-15480.
- Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., Saller, R. (2009): Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties - an Overview. *Forschende Komplementärmedizin.* **16**: 79-90.
- Ritch-Krc, E. M., Thomas, S., Turner, N. J., Towers, G. H. N. (1996): Carrier herbal medicine: traditional and contemporary plant use. *Journal of Ethnopharmacology.* **52**: 85-94.
- Rogosic, J., Pfister, J. A., Provenza, F. D., Grbesa, D. (2006): Sheep and goat preference for and nutritional value of Mediterranean maquis shrubs. *Small Ruminant Research.* **64**: 169-179.
- Rosa, J. S., Mascarenhas, C. Oliveira, L., Teixeira, T., Barreto, M. C., Medeiros, J. (2010): Biological activity of essential oils from seven Azorean plants against *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Applied Entomology.* **134**: 346-354.
- Rossini, C., Castillo, L., González, A. (2008): Plant extracts and their components as potential control agents against human head lice. *Phytochemistry Review.* **7**: 51-63.
- Ruberto, G., Baratta, M. T. (2000): Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry.* **69**: 167-174.
- Sadeghi-aliabadi, H., Emami, A., Saidi, M., Sadeghi, B., Jafarian, A. (2009): Evaluation of In Vitro Cytotoxic Effects of *Juniperus foetidissima* and *Juniperus sabina* Extracts Against a Panel of Cancer Cells. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research.* **8**: 281-286.
- Sánchez-Moreno, C. (2002): Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Science and Technology International.* **8**: 121-137.
- Sarker, S. D., Nahar, L., Kumarasamy, Y. (2007): Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods.* **42**: 321-324.
- Schelz, Z., Molnar, J., Hohmann, J. (2006): Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia.* **77**: 279-285.
- Schepetkin, I. A., Faulkner, C. L., Nelson-Overton, L. K., Wiley, J. A., Quinn, M. T. (2005): Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Juniperus scopolorum*. *International Immunopharmacology.* **5**: 1783-1799.
- Schildknecht, S., Bachschmid, M., Baumann, A., Ullrich, V. (2004): COX-2 inhibitors selectively block prostacyclin synthesis in endotoxin exposed vascular smooth muscle cells. *The FASEB Journal.* **18**: 757-759.
- Schneider, I., Bucar, F. (2005): Lipoxygenase inhibitors from natural plant sources. Part 2: medicinal plants with inhibitory activity on arachidonate 12-lipoxygenase, 15-lipoxygenase and leukotriene receptor antagonists. *Phytoterapy Research.* **19**: 263-272.
- Schneider, I., Gibbons, S., Bucar, F. (2004): Inhibitory Activity of *Juniperus communis* on 12(S)-HETE Production in Human Platelets. *Planta Medica.* **70**: 471-474.
- Seca, A. M. L., Silva, A. M. S. (2007): The chemical composition of the *Juniperus* genus (1970-2004). In Govil, J. N., Singh, V. K., Bhardwaj, R. *Recent Progress in Medicinal Plants Source* Vol. 16. *Phytomedicines*. Studium Press LLC, Houston, USA.
- Semiz, G., Isik, K., Unal, O. (2007): Enek Pekmez Production from Juniper "Fruits" by Native People on the Taurus Mountains in Southern Turkey. *Economic Botany.* **61**: 299-301.

- Separovic, D., Dorman, R. V. (1993): Prostaglandin F₂ alpha synthesis in the hippocampal mossy fiber synaptosomal preparation: I. Dependence in arachidonic acid, phospholipase A₂, calcium availability and membrane depolarization. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. **48**: 127-137.
- Sezik, E., Yeşilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y., Tanaka, T. (2001): Traditional medicine in Turkey. X. Folk medicine in Central Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*. **75**: 95-115.
- Sezik, E., Yeşilada, E., Tabata, M., Honda, G., Takaishi, Y., Fujita, T., Tanaka, T., Takeda, Y. (1997): Traditional Medicine in Turkey. VIII. Folk Medicine in East Anatolia; Erzurum, Erzincan, Ağrı, Kars, Iğdır Provinces. *Economic Botany*. **51**: 195-211.
- Sezik, E., Zor, M., Yeşilada, E. (1992): Traditional Medicine in Turkey II. Folk Medicine in Kastamonu. *International Journal of Pharmacognosy*. **30**: 233-239.
- Shahmir, F., Ahmadi, L., Mirza M., Korori, S. A. A. (2003): Secretory elements of needles and berries of *Juniperus communis* L. ssp. *communis* and its volatile constituents. *Flavour and Fragrance Journal*. **18**: 425-428.
- Shanjani, P. S., Mirza, M., Calagari, M., Adams, R. P. (2010): Effects drying and harvest season on the essential oil composition from foliage and berries of *Juniperus excelsa*. *Industrial Crops and Products*. **32**: 83-87.
- Sharma, P. K., Chauhan, N. S., Lal, B. (2004): Observations on the traditional phytotherapy among the inhabitants of Parvati valley in western Himalaya, India. *Journal of Ethnopharmacology*. **92**: 167-176
- Shin, S. (2003): Anti-*Aspergillus* Activities of Plant Essential Oils and Their Combination Effects with Ketoconazole or Amphotericin B. *Archives of Pharmacal Research*. **26**: 389-393.
- Shipley, L. A., Blomquist, S., Danell, K. (1998): Diet choices made by free-ranging moose in northern Sweden in relation to plant distribution, chemistry, and morphology. *Canadian Journal of Zoology*. **76**: 1722-1733.
- Shokrzadeh, M., Azadbakht, M., Ahangar, N., Naderi, H., Saravi, S. S. S. (2010): Comparison of the cytotoxic effects of *Juniperus sabina* and *Zataria multiflora* extracts with *Taxus baccata* extract and Cisplatin on normal and cancer cell lines. *Pharmacognosy Magazine*. **6**: 102-105.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M. (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. **299**: 152-178.
- Slambrouck, S. V., Daniels, A. L., Hooten, C. J., Brock, S. L., Jenkins, A. R., Ogasawara, M. A., Baker, J. M., Adkins, G., Elias, E. M., Agustin, V. J., Constantine, S. R., Pullin, M. J., Shors, S. T., Kornienko, A., Steelant, W. F. A. (2007): Effects of crude aqueous medicinal plant extracts on growth and invasion of breast cancer cells. *Oncology Reports*. **17**: 1487-1492.
- Smith, W. L. (1989): The eicosanoids and their biochemical mechanism of action. *Biochemical Journal*. **259**: 315-324.
- Soković, M. D., Ristić, M., Grubišić, D. (2004): Chemical Composition and Antifungal Activity of the Essential Oil from *Juniperus excelsa* Berries. *Pharmaceutical Biology*. **42**: 328-331.
- Song, I., Ball, T. M., Smith, W. L. (2001): Different Suicide Inactivation Processes for the Peroxidase and Cyclooxygenase Activities of Prostaglandin Endoperoxide H Synthase-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **289**: 869-875.
- Starčević, V. P. (1999): *Eikosanoidni sistemi*. U: *Kompendijum iz endokrinologije*. Medicinski fakultet, Beograd, Republika Srbija.

- Stassi, V., Verykokidou, E., Loukis, A., Harvala, C., Philianos, S. (1996): The Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Four *Juniperus* Species Growing Wild in Greece. *Flavour and Fragrance Journal*. **11**: 71-74.
- Sugawara, Y., Hino, Y., Kawasaki, M., Hara, C., Tamura, K., Sugimoto, N., Yamanishi, Y., Miyauchi, M., Masujima, T., Aoki, T. (1999): Alteration of Perceived Fragrance of Essential Oils in Relation to Type of Work: a Simple Screening Test for Efficacy of Aroma. *Chemical Senses*. **24**: 415-421.
- Szabó, M. A., Varga, G. Z., Hohmann, J., Schelz, Z., Szegedi, E., Amaral, L., Molnár, J. (2010): Inhibition of Quorum-sensing Signals by Essential Oils. *Phytotherapy Research*. **24**: 782-786.
- Tam, T. W., Liu, R., Arnason, J. T., Krantis, A., Staines, W. A., Haddad, P. S., Foster, B. C. (2009): Actions of ethnobotanically selected Cree anti-diabetic plants on human cytochrome P450 isoforms and flavin-containing monooxygenase 3. *Journal of Ethnopharmacology*. **126**: 119-126.
- Tao, J., Hu, Q., Yang, J., Li, R., Li, X., Lu, C., Chen, C., Wang, L., Shattock, R., Ben, K. (2007): In vitro anti-HIV and -HSV activity and safety of sodium rutin sulfate as a microbicide candidate. *Antiviral Research*. **75**: 227-233.
- Thappa, R. K., Aggarwal, S. G., Kapahi, B. K., Sarin, Y. K. (1987): *Juniperus excelsa* Leaf Oil, a New Source of Cedrol. *Journal of Natural Products*. **50**: 323-324.
- The Silver Spoon* (2005): Phaidon Press, London, UK.
- Thomas, P. A., El-Barghathi, M., Polwart, A. (2007): Biological Flora of the British Isles: *Juniperus communis* L. *Journal of Ecology*. **95**: 1404-1440.
- Thunnissen, M. M. G. M., Nordlund, P., Haeggström, J. Z. (2001): Crystal structure of human leukotriene A₄ hydrolase, a bifunctional enzyme in inflammation. *Nature Structural Biology*. **8**: 131-135.
- Topçu, G., Erenler, R., Çakmak, O., Johansson, C. B., Çelik, C., Chai, H., Pezzuto, J. M. (1999): Diterpenes from the berries of *Juniperus excelsa*. *Phytochemistry*. **50**: 1195-1199.
- Topçu, G., Gören, A. C., Bilsel, G., Bilsel, M., Çakmak, O., Schilling, J., Kingston, D. G. I. (2005): Cytotoxic Activity and Essential Oil Composition of Leaves and Berries of *Juniperus exelsa*. *Pharmaceutical Biology*. **43**: 125-128.
- Tserennadmid, R., Takó, M., Galgóczy, L., Papp, T., Vágvölgyi, C., Gerő, L., Krisch, J. (2010): Antibacterial effect of essential oils and interaction with food components. *Central European Journal of Biology*. **5**: 641-648.
- Tunalier, Z., Kirimer, N., Baser, K. H. C. (2002): The composition of essential oils from various parts of *Juniperus foetidissima*. *Chemistry of Natural Compounds*. **38**: 43-47.
- Tunón, H., Olavsdotter, C., Bohlin, L. (1995): Evaluation of anti-inflammatory activity of some Swedish medicinal plants. Inhibition of prostaglandin biosynthesis and PAF-induced exocytosis. *Journal of Ethnopharmacology*. **48**: 61-76.
- Tuzlacı, E., Aymaz, P. E. (2001): Turkish folk medicinal plants, Part IV: Gönen (Balıkesir). *Fitoterapia*. **72**: 323-343.
- Tuzlacı, E., Erol, M. K. (1999): Turkish folk medicinal plants. Part II: Eğirdir (Isparta). *Fitoterapia*. **70**: 593-610.
- Tuzlacı, E., Tolon, E. (2000): Turkish folk medicinal plants, part III: Şile (Istanbul). *Fitoterapia*. **71**: 673-685.
- Ugurlu, E., Secmen, O. (2008): Medicinal plants popularly used in the villages of Yunt Mountain (Manisa-Turkey). *Fitoterapia*. **79**: 126-131.
- Ullrich, V., Brugger, R. (1994): Prostacyclin and Thromboxane Synthase: New Aspects of Hemethiolate Catalysis. *Angewandte Chemie International Edition in English*. **33**: 1911-1919.

- Unlu, M., Vardar-Unlu, G., Vural, N., Donmez, E., Cakmak, O. (2008): Composition and antimicrobial activity of *Juniperus excelsa* essential oil. *Chemistry of Natural Compounds*. **44**: 129-131.
- Vardhini, D., Raja, S. S., Varalakshmi, K., Quddus, K. M. A. (2001): Sujiol, a new potent insect growth regulator from *Juniperus communis* L. against last instar larvae of *Spodoptera litura*. *The Journal of Applied Entomology*. **125**: 479-481.
- Veljković, V. B., Stanković, M. Z. (2003): *Herbs used in alcoholic drinks*. In Caballero, B. *Encyclopedia of Food Scienc and Nutrition*. 2 ed. Academic Press, London, UK.
- Vernin, G., Boniface, C., Metzger, J., Ghiglione, C., Hammoud, A., Suon, K., Fraise, D., Párkányi, C. (1988): GC-MS-SPECMA bank analysis of *Juniperus communis* needles and berries. *Phytochemistry*. **27**: 1061-1064.
- Vichi, S., Aumatell, M. R., Buxaderas, S., López-Tamames, E. (2008): Assessment of some diterpenoids in commercial distilled gin. *Analytica Chimica Acta*. **628**: 222-229.
- Vichi, S., Riu-Aumatell, M., Mora-Pons, M., Buxaderas, S., López-Tamames, E. (2005): Characterization of Volatiles in Different Dry Gins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**: 10154-10160.
- Vichi, S., Riu-Aumatell, M., Mora-Pons, M., Guadayol, J. M., Buxaderas, S., López-Tamames, E. (2007): HS-SPME coupled to GC/MS for quality control of *Juniperus communis* L. berries used for gin aromatization. *Food Chemistry*. **105**: 1748-1754.
- Vidaković, M (1982): *Četinjače morfologija i varijabilnost*. Jugoslavenska akademija znanosti i umjetnosti, Sveučilišna naklada Liber, Zagreb, SFRJ.
- Waldron, D. F., Taylor, Jr. C. A., Walker, J. W., Campbell, E. S., Lupton, C. J., Willingham, T. D., Landau, S. Y. (2009): Heritability of juniper consumption in goats. *Journal of Animal Science*. **87**: 491-495.
- Walther, M., Holzhütter, H. G., Kuban, R. J., Wiesner, R., Rathmann, J., Kühn, H. (1999): The inhibition of mammalian 15-lipoxygenases by the anti-inflammatory drug ebselen: dual-type mechanism involving covalent linkage and alteration of the iron ligand sphere. *Molecular Pharmacology*. **56**: 196-203.
- Webster, D., Lee, T. D. G., Moore, J., Manning, T., Kunimoto, D., LeBlanc, D., Johnson, J. A., Gray, C. A. (2010): Antimycobacterial screening of traditional medicinal plants using the microplate resazurin assay. *Canadian Journal of Microbiology*. **56**: 487-494.
- Wei, A., Shibamoto, T. (2007): Antioxidant Activities and Volatile Constituents of Various Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **55**: 1737-1742.
- Wei, A., Shibamoto, T. (2010): Antioxidant/Lipoxygenase Inhibitory Activities and Chemical Compositions of Selected Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **58**: 7218-7225.
- Werz, O., Steinhilber, D. (2005): Development of 5-lipoxygenase inhibitors-lessons from cellular enzyme regulation. *Biochemical Pharmacology*. **70**: 327-333.
- Whiting, P. W., Clouston, A., Kerlin, P. (2002): Black cohosh and other herbal remedies associated with acute hepatitis. *The Medical Journal of Australia*. **177**: 432-435.
www.netterimages.com/image/11131.htm
www.nextpharmaceuticals.com
- Yarnell, E., Abascal, K. (2007): Botanical Medicine for Headache. *Alternative and Complementary Therapies*. **13**: 148-152.
- Yeşilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Fujita, T., Tanaka, T., Takeda, Y., Takaishi, Y. (1995): Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. *Journal of Ethnopharmacology*. **46**: 133-152.
- Yeşilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Goto, K., Ikeshiro, Y. (1993): Traditional medicine in Turkey. IV. Folk medicine in the Mediterranean subdivision. *Journal of Ethnopharmacology*. **39**: 31-38.

- Yokoyama, C., Miyata, A., Suzuki, K., Nishikawa, Y., Yoshimoto, T., Yamamoto, S., Nüsing, R. Ullrich, V., Tanabe, T. (1993) Expression of human thromboxane synthase using a baculovirus system. *FEBS Letters*. **318**: 91-94.
- Young, R. N. (1999): Inhibitors of 5-lipoxygenase: a therapeutic potential yet to be fully realized? *European Journal of Medicinal Chemistry*. **34**: 671-685.
- Zhang, F., Altorki, N. K., Mestre, J. R., Subbaramaiah, K., Dannenberg, A. J. (1999): Curcumin inhibits cyclooxygenase-2 transcription in bile acid- and phorbol ester-treated human gastrointestinal epithelial cells. *Carcinogenesis*. **20**: 445-451.

8. PRILOG

8.1. Fitohemijski skrining

8.1.1. LC-MS/MS skrining odabranih fenolnih jedinjenja

izoramnetin	10.19	1.45	1.93	1.17	6.00	3.11	6.21	2.51	6.21	1.74	1.55	n.d.	5.58	0.24	0.51	n.d.
kemferol	87.63	1.93	7.97	1.54	14.00	6.94	75.43	16.80	3.51	1.77	5.14	n.d.	8.20	0.96	1.34	n.d.
kemferol-3-O-glukozid	499.47	38.09	181.37	67.46	405.65	106.70	464.25	249.17	521.46	126.97	205.76	9.72	1318.08	356.00	225.64	10.07
krizoeriol	74.34	2.42	3.59	0.98	33.73	50.24	26.47	25.58	22.57	2.76	3.31	0.34	20.84	1.14	2.14	0.46
luteolin	190.82	15.55	17.58	6.41	65.71	64.67	199.25	348.47	28.66	19.35	4.06	2.09	47.26	8.03	26.39	3.21
luteolin-7-O-glukozid	270.28	103.97	496.82	81.49	623.29	1462.23	33.80	1624.18	617.18	343.55	368.59	135.47	269.35	1434.33	116.40	80.29
kvercetin	571.81	24.66	68.21	5.42	151.11	34.75	640.97	72.47	108.47	63.96	112.85	4.89	154.08	3.95	14.99	1.75
kvercitrin	259.42	39.93	15153.80	177.43	141862.68	44964.07	2038.23	683.56	125214.86	67416.64	118.56	3.21	89522.93	31027.58	767.59	156.55
kvercetin-3-O-glukozid	2596.00	98.48	1010.50	108.60	1660.19	2299.76	4625.11	2008.83	13205.56	11129.58	767.46	62.31	15058.27	5764.93	279.37	55.26
hiperozid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	173.24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
rutin	103831.66	2217.03	106137.65	477.67	14652.44	3872.95	198715.57	22953.07	48184.31	45858.28	112281.81	2117.89	58412.12	18022.41	38.33	8.27
miricetin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	67.76	2.28	22.39	n.d.	11.38	n.d.	2.73	n.d.	6.15	n.d.	5.09	n.d.
naringenin	424.15	8.06	36.98	18.49	22.59	46.58	153.63	42.19	80.07	20.94	25.08	1.36	29.28	9.02	9.78	3.30
epikatehin	14263.16	205.83	3510.56	14.96	11131.13	7363.68	12734.62	1308.16	78388.82	24355.33	6137.62	7.45	13153.92	7.45	1779.94	n.d.
katehin	103267.99	4127.54	29471.03	251.13	234390.93	56532.09	146439.24	15655.97	202920.15	61362.93	58302.89	15.07	124883.60	379.75	23409.43	22.75
epigalokatehin galat	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
kumarini																
umbeliferon	38098.24	29.88	167.67	2.93	404.23	3.45	3828.62	25.93	299.05	20.32	257.83	n.d.	786.51	135.09	95.84	7.23
eskuletin	117.85	1.47	0.74	n.d.	1.74	5.68	17.51	n.d.	0.74	n.d.	2.37	n.d.	10.21	n.d.	0.84	n.d.
skopoletin	31.82	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
lignani																
matairezinol	4620.08	461.28	1423.32	223.18	122.21	4943.57	1222.94	1124.00	1222.94	575.18	351.08	1445.71	439.32	880.76	161.83	162.45
sekoizolaricirezinol	1184.28	599.40	1576.82	235.83	12.84	n.d.	650.41	79.57	71.64	n.d.	11.75	n.d.	128.57	12.84	31.08	5.47

n.d – nije detektovano

8.1.2. GC-MS analiza etarskih ulja

13.52	1521		?	-	-	-	-	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
13.53	1522	1514	γ -kadinen	-	0.3	2.9	1.6	-	-	0.5	0.7	0.6	-	0.7	1.3	0.7	0.5	0.8	0.3
13.55	1524		seskviterpen	-	-	-	-	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
13.59	1529	1523	δ -kadinen	0.7	1.3	2.3	2.1	0.8	-	1.5	2.2	2.9	0.8	3.0	3.1	2.8	1.2	2.6	0.9
13.63	1533	1530	zonaren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5	-
13.73	1546	1539	α -kadiden	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4	-	-	-
13.82	1556	1550	elemol	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	1.4	1.0	0.5	-
13.88	1563	1553	seskviterpen	-	-	0.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13.96	1572	1561	germakren B	0.7	4.6	-	-	-	-	4.0	5.2	-	0.6	-	-	1.0	2.2	1.6	0.9
14.10	1589		seskviterpen	-	-	-	-	-	-	-	3.2	-	0.3	-	-	-	0.5	-	-
14.15	1596		seskviterpen	-	-	0.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14.28	1612	1595	salvial-4(14)-en-1-on	-	-	-	-	2.4	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14.38	1625	1601	kedrol	-	-	-	-	37.4	7.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14.39	1626		seskviterpen	-	-	1.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4	-	-	-
14.53	1645	1629	1-epi-kubenol	-	-	1.1	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.1	-
14.63	1658	1640	epi- α -kadinol	-	-	1.1	0.9	-	-	-	0.9	1.4	0.5	-	-	0.8	-	-	-
14.74	1673	1654	α -kadinol	-	-	-	0.7	-	-	-	1.7	1.7	0.9	-	-	1.2	0.8	0.8	-
14.76	1675		seskviterpen	-	-	2.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15.02	1711	1688	eudezma-4(15),7-dien-1- β -ol	-	-	0.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17.23	2050	1998	manoil-oksidi	-	-	0.9	3.8	-	-	-	-	-	-	-	0.9	-	-	-	-
17.34	2068		diterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	0.3	-	-
17.39	2077	2023	abieta-8,12-dien	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.8	-	-	-	0.6	-	-
17.58	2106	2057	abietatrien	-	-	1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17.75	2135	2088	abietadien	-	-	3.6	0.8	0.2	0.5	-	-	-	8.6	-	-	-	3.5	-	-
18.13	2196	2154	abieta-8(14),13(15)-dien	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9	-	-	-	0.3	-	-
18.35	2232	2185	sandarakopimaradien-18-al	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5	-	-	-	-	-	-
18.53	2262		diterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	-	-	-	-	-	-
18.60	2273		diterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.8	-	-	-	-	-	-
18.96	2332	2299	4-epi-abietal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.5	-	-	-	1.2	-	-
19.04	2346	2313	abieta-7,13-dien-3-on	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9	-	-	-	1.1	-	-
19.25	2380	2344	4-epi-abietol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-
19.43	2410		diterpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-
19.57	2432	2402	abietol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.2	-	-	-	-	-	-
monoterpenski ugljovodonici				89.8	76.7	57.2	69.6	52.1	89.6	86.7	63.6	73.2	53.0	78.8	89.2	75.4	80.9	64.6	83.3
oksidovani monoterpeni				5.8	2.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.6	18.6	8.2	0.7	0.0	13.4	2.9	7.1	1.1
seskviterpeni				2.6	19.1	28.9	20.5	41.5	7.7	11.3	23.2	1.5	9.4	16.8	5.5	3.3	5.8	21.8	14.2
oksidovani seskviterpeni				1.8	1.6	8.3	5.3	5.9	1.7	2.0	6.6	6.6	2.2	3.7	4.4	7.9	3.5	6.4	1.2
diterpeni				0.0	0.0	5.6	4.6	0.2	0.5	0.0	0.0	0.0	19.3	0.0	0.9	0.0	5.8	0.0	0.0
ukupno				100.0	99.4	100.0	100.0	99.7	100.0	100.0	100.0	99.9	92.1	100.0	100.0	100.0	98.9	99.9	99.8

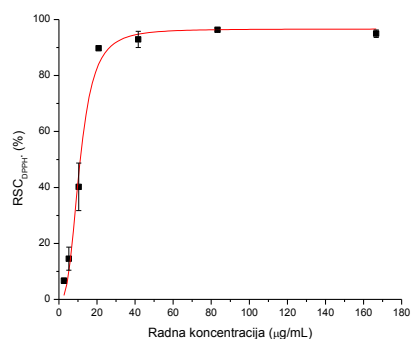
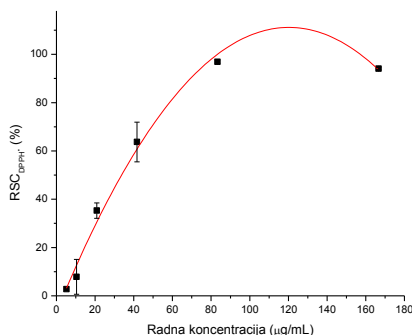
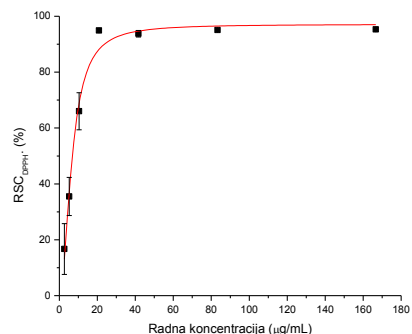
8.2. Antioksidantni potencijal

8.2.1. Neutralizacija DPPH[•] radikala

Tabela 8.3. Neutralizacija DPPH[•] radikala

(*J. communis*/iglice; *J. communis*/šišarke; *J. macrocarpa*/iglice - ekstrakti)

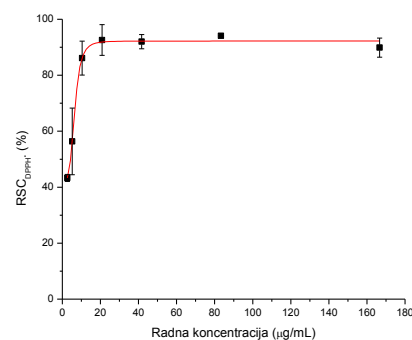
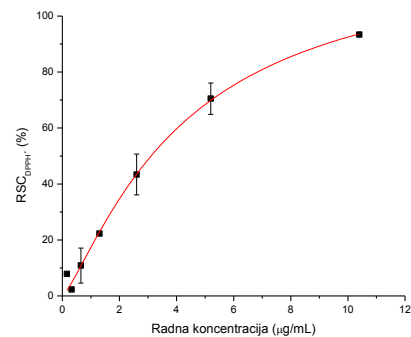
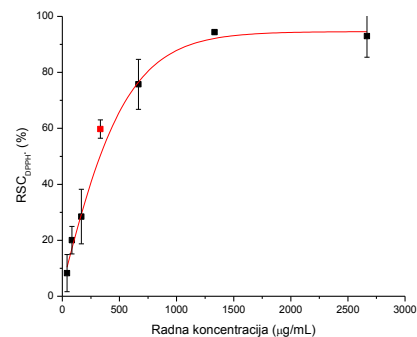
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC _{DPPH[•]} (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. communis</i> /iglice								
2.60	0.347	0.306	0.366	0.059	14.49	26.71	8.93	16.71
5.20	0.240	0.272	0.284	0.048	43.12	33.48	29.88	35.50
10.40	0.170	0.173	0.133	0.044	62.57	61.81	73.66	66.01
20.83	0.058	0.061	0.062	0.043	95.60	94.71	94.51	94.94
41.67	0.074	0.066	0.069	0.049	92.48	94.82	93.99	93.76
83.33	0.063	0.065	0.065	0.048	95.48	94.88	94.93	95.10
166.67	0.049	0.050	0.050	0.033	95.47	95.23	95.17	95.29
Kontrol	0.396	0.372	0.367	0.041	6.56	6.78	6.97	
IC ₅₀ (µg/mL)					6.56	6.78	6.97	6.77 ±0.21
<i>J. communis</i> /šišarke								
2.60	0.410	0.399	0.434	0.052	-6.06	-2.99	-13.23	-7.43
5.20	0.374	0.398	0.404	0.047	2.80	-4.24	-5.91	2.80
10.40	0.356	0.368	0.321	0.038	5.55	2.12	15.97	7.88
20.83	0.265	0.264	0.246	0.040	33.31	33.61	38.97	35.30
41.67	0.179	0.125	0.163	0.033	56.87	72.82	61.43	63.71
83.33	0.057	0.060	0.062	0.049	97.57	96.86	96.27	96.90
166.67	0.050	0.051	0.053	0.031	94.42	94.27	93.67	94.12
Kontrol	0.396	0.372	0.367	0.041				
IC ₅₀ (µg/mL)					35.42	33.15	31.94	33.50 ±1.77
<i>J. macrocarpa</i> /iglice								
2.60	0.364	0.368	0.395	0.051	7.33	5.96	-1.87	6.64
5.20	0.323	0.351	0.335	0.048	18.51	10.26	14.84	14.54
10.40	0.268	0.238	0.210	0.037	31.65	40.34	48.66	40.22
20.83	0.078	0.157	0.066	0.043	89.73	66.30	93.36	89.73
41.67	0.068	0.050	0.052	0.033	89.60	94.96	94.16	92.91
83.33	0.050	0.049	0.050	0.038	96.19	96.53	96.36	96.36
166.67	0.054	0.045	0.048	0.032	93.50	96.12	95.26	94.96
Kontrol	0.396	0.372	0.367	0.041				
IC ₅₀ (µg/mL)					12.07	12.12	10.60	11.60 ±0.86



Grafik 8.1. Zavisnost RSC_{DPPH[•]} – radna koncentracija ekstrakta
J. communis/iglice
J. communis/šišarke
J. macrocarpa/iglice

Tabela 8.4. Neutralizacija DPPH[•] radikala
(*J. macrocarpa*/šišarke; *J. excelsa*/iglice; *J. excelsa*/šišarke - ekstrakti)

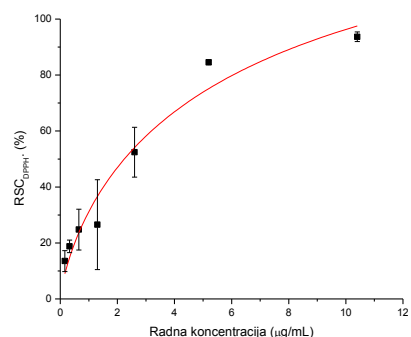
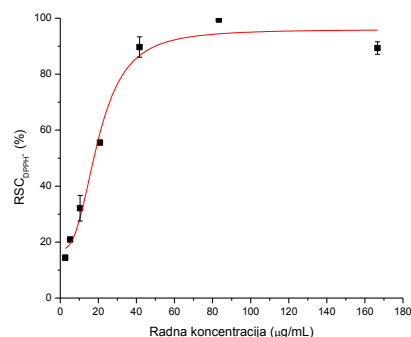
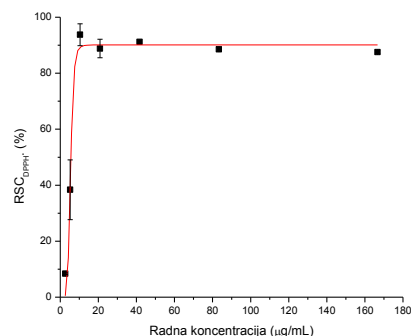
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC _{DPPH[•]} (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. macrocarpa</i> /šišarke								
41.67	0.185	0.205	0.199	0.051	15.62	2.70	6.49	8.27
83.33	0.174	0.187	0.173	0.051	22.51	14.41	23.29	20.07
166.67	0.146	0.177	0.157	0.046	37.07	17.92	30.45	28.48
333.33	0.109	0.116	0.112	0.049	62.08	57.45	60.29	59.76
666.67	0.073	0.087	0.102	0.049	84.56	75.97	66.71	75.75
1333.33	0.056	0.058	0.057	0.048	95.08	93.85	94.15	94.36
2666.67	0.081	0.065	0.057	0.056	84.82	94.41	99.65	92.96
Kontrol	0.197	0.218	0.212	0.049				
IC ₅₀ (µg/mL)					323.6 9	310.8 9	333.7 8	322.79 ±11.47
<i>J. excelsa</i> /iglice								
0.16	0.179	0.179	0.200	0.043	7.74	7.84	-6.18	7.84
0.33	0.188	0.197	0.193	0.044	2.30	-3.77	-1.18	2.30
0.65	0.164	0.178	0.182	0.044	17.94	8.49	6.13	10.85
1.30	0.138	0.156	0.147	0.042	34.96	22.27	28.33	22.27
2.60	0.113	0.132	0.132	0.043	51.81	39.17	39.15	43.38
5.20	0.080	0.096	0.088	0.045	75.95	64.78	70.73	70.48
10.40	0.054	0.054	0.054	0.044	93.60	93.51	93.01	93.37
Kontrol	0.183	0.197	0.192	0.043				
IC ₅₀ (µg/mL)					2.43	3.59	3.3	3.45 ±0.21
<i>J. excelsa</i> /šišarke								
2.60	0.173	0.171	0.175	0.078	43.31	44.55	42.03	43.30
5.20	0.103	0.136	0.139	0.053	70.06	50.42	48.56	56.35
10.40	0.057	0.073	0.076	0.046	93.06	83.58	81.76	86.13
20.83	0.060	0.060	0.076	0.053	95.83	95.70	86.24	92.59
41.67	0.062	0.060	0.068	0.050	92.94	93.96	89.12	92.00
83.33	0.059	0.059	0.059	0.049	94.11	94.16	94.05	94.11
166.67	0.066	0.074	0.062	0.050	90.67	86.14	92.84	89.88
Kontrol	0.211	0.220	0.221	0.050				
IC ₅₀ (µg/mL)					3.96	5.16	5.39	5.28 ±0.16



Grafik 8.2. Zavisnost RSC_{DPPH[•]} – radna koncentracija ekstrakta
J. macrocarpa/šišarke;
J. excelsa/iglice;
J. excelsa/šišarke

Tabela 8.5. Neutralizacija DPPH[•] radikala
(*J. sibirica*/iglice; *J. sibirica*/šišarke; *J. foetidissima*/iglice - ekstrakti)

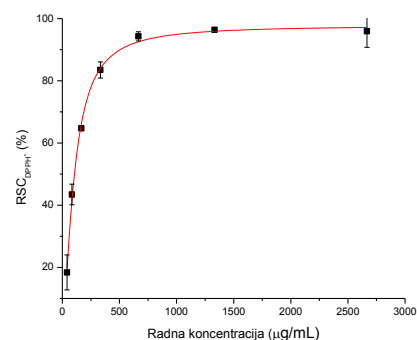
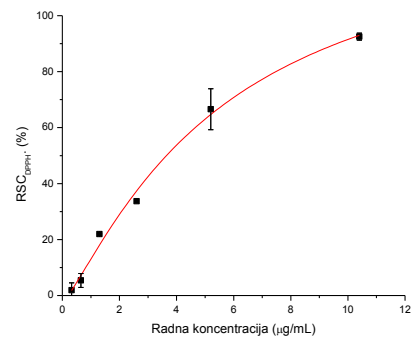
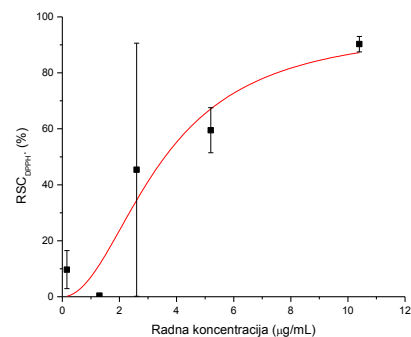
Radna konc. (µg/mL).	Apsorbancija				RSC _{DPPH[•]} (%)			
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	Srednja vrednost
<i>J. sibirica</i> /iglice								
2.60	0.168	0.167	0.167	0.041	8.10	8.36	8.71	8.39
5.20	0.145	0.126	0.116	0.044	26.70	40.74	47.68	38.37
10.40	0.061	0.058	0.068	0.054	94.79	97.06	89.45	93.76
20.83	0.065	0.056	0.059	0.045	85.14	91.48	89.86	88.83
41.67	0.098	0.078	0.057	0.045	61.49	75.85	91.22	91.22
83.33	0.060	0.061	0.060	0.044	89.07	87.83	88.66	88.52
166.67	0.064	0.063	0.064	0.047	87.34	88.22	87.16	87.57
Kontrol	0.225	0.226	0.209	0.036				
IC ₅₀ (µg/mL)					5.41	5.29	5.25	5.32±0.08
<i>J. sibirica</i> /šišarke								
2.60	0.187	0.190	0.188	0.047	15.21	13.55	14.54	14.44
5.20	0.180	0.179	0.180	0.048	20.73	21.20	20.84	20.92
10.40	0.152	0.161	0.168	0.048	36.82	31.89	27.63	32.11
20.83	0.123	0.123	0.122	0.049	55.14	55.50	56.04	55.56
41.67	0.056	0.066	0.067	0.046	93.85	88.14	87.10	89.70
83.33	0.065	0.064	0.065	0.064	99.46	99.94	99.10	99.50
166.67	0.063	0.070	0.067	0.049	91.74	87.29	89.04	89.35
Kontrol	0.200	0.204	0.203	0.036				
IC ₅₀ (µg/mL)					16.7	17.58	18.39	17.56±0.85
<i>J. foetidissima</i> /iglice								
0.16	0.168	0.162	0.158	0.043	9.48	14.24	16.84	13.52
0.33	0.153	0.158	0.184	0.044	20.38	17.22	-2.13	18.80
0.65	0.139	0.146	0.159	0.044	31.47	25.87	17.01	24.78
1.30	0.123	0.155	0.165	0.046	44.54	21.28	13.74	26.52
2.60	0.098	0.119	0.119	0.046	62.69	47.48	47.12	52.43
5.20	0.063	0.067	0.069	0.047	88.65	85.15	83.98	84.57
10.40	0.052	0.055	0.056	0.046	95.65	92.97	92.43	93.68
Kontrol	0.192	0.172	0.179	0.043				
IC ₅₀ (µg/mL)					1.57	2.48	2.68	2.58±0.14



Grafik 8.3. Zavisnost RSC_{DPPH[•]} – radna koncentracija ekstrakta
J. sibirica/iglice;
J. sibirica/šišarke;
J. foetidissima/iglice

Tabela 8.6. Neutralizacija DPPH[•] radikala
(*J. foetidissima*/šišarke; *J. oxycedrus*/iglice; *J. oxycedrus*/šišarke - ekstrakti)

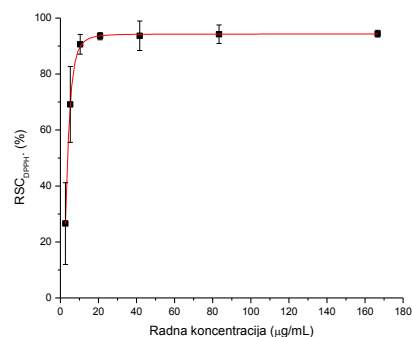
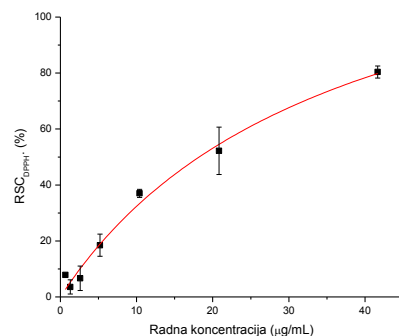
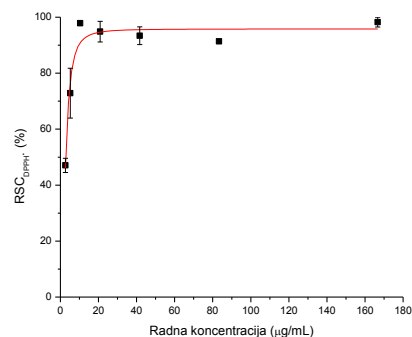
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC _{DPPH[•]} (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. foetidissima</i> /šišarke								
0.16	0.180	0.159	0.147	0.045	-12.98	4.89	14.50	9.69
0.33	0.194	0.187	0.195	0.045	-23.67	-17.78	-24.98	-22.15
0.65	0.189	0.189	0.192	0.043	-21.65	-21.95	-24.44	-22.68
1.30	0.164	0.171	0.168	0.044	0.36	-5.99	-3.31	0.36
2.60	0.049	0.145	0.140	0.046	97.54	17.56	21.03	45.37
5.20	0.086	0.105	0.090	0.045	65.57	50.35	62.53	59.49
10.40	0.055	0.055	0.061	0.045	91.92	91.79	87.05	90.26
Kontrol	0.187	0.173	0.154	0.052				
IC ₅₀ (µg/mL)					3.68	5.18	4.25	3.97 ±0.4
<i>J. oxycedrus</i> /iglice								
0.16	0.213	0.216	0.206	0.045	-4.45	-6.22	-0.25	-3.64
0.33	0.199	0.207	0.205	0.044	3.76	-1.39	0.09	1.93
0.65	0.192	0.200	0.198	0.044	8.11	3.22	4.84	5.39
1.30	0.169	0.168	0.159	0.043	21.77	22.12	28.06	21.94
2.60	0.205	0.179	0.151	0.044	0.37	16.41	33.68	33.68
5.20	0.085	0.109	0.100	0.044	74.39	59.87	65.48	66.58
10.40	0.169	0.057	0.060	0.046	23.90	93.42	91.63	92.53
Kontrol	0.213	0.206	0.194	0.043				
IC ₅₀ (µg/mL)					3.11	4.00	3.75	3.62 ±0.46
<i>J. oxycedrus</i> /šišarke								
41.67	0.172	0.188	0.173	0.047	21.76	11.87	21.49	18.37
83.33	0.138	0.149	0.145	0.054	47.10	40.54	42.71	43.45
166.67	0.103	0.131	0.128	0.047	64.71	47.21	49.15	64.71
333.33	0.072	0.080	0.075	0.049	86.02	80.82	83.61	83.48
666.67	0.057	0.061	0.058	0.049	95.44	92.63	94.84	94.30
1333.33	0.056	0.057	0.057	0.051	96.64	96.32	96.22	96.39
2666.67	0.080	0.063	0.065	0.064	90.00	98.25	99.55	95.93
Kontrol	0.172	0.188	0.173	0.047				
IC ₅₀ (µg/mL)					96.03	116.73	102.99	105.25 ±10.53



Grafik 8.4. Zavisnost RSC_{DPPH[•]} – radna koncentracija ekstrakta
J. foetidissima/šišarke;
J. oxycedrus/iglice;
J. oxycedrus/šišarke

Tabela 8.7. Neutralizacija DPPH[•] radikala
(*J. sabina*/iglice; *J. sabina*/šišarke; *J. phoenicea*/iglice - ekstrakti)

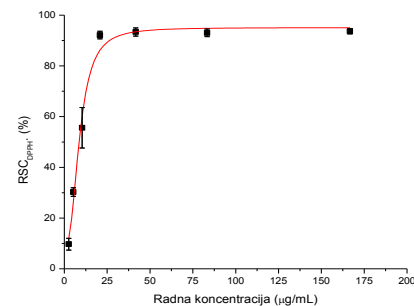
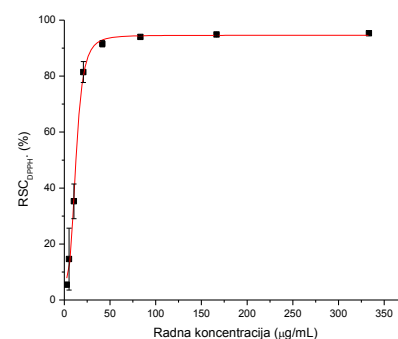
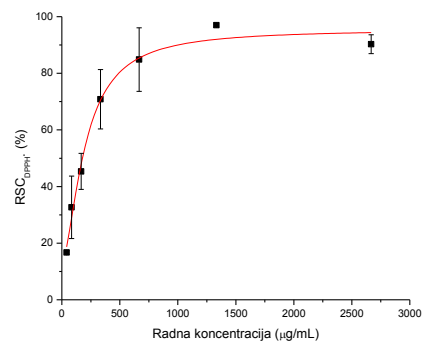
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC _{DPPH[•]} (%)			
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	Srednja vrednost
<i>J. sabina</i> /iglice								
2.60	0.133	0.137	0.14	0.055	49.61	47.06	44.54	47.07047
5.20	0.089	0.114	0.09	0.056	78.43	62.60	77.58	72.86973
10.40	0.075	0.077	0.07	0.072	98.06	96.92	98.55	97.84322
20.83	0.056	0.067	0.06	0.054	98.76	91.44	94.32	94.84039
41.67	0.064	0.058	0.06	0.053	92.92	96.77	90.49	93.39132
83.33	0.059	0.058	0.05	0.045	90.96	91.57	91.62	91.38467
166.67	0.068	0.073	0.07	0.068	99.60	96.29	98.84	98.24391
Kontrol	0.133	0.137	0.14	0.055				
IC ₅₀ (µg/mL)					2.65	3.01	2.87	2.84 ±0.18
<i>J. sabina</i> /šišarke								
0.65	0.194	0.210	0.208	0.043	7.89	-1.33	-0.25	7.89
1.30	0.200	0.214	0.206	0.044	5.37	-3.46	1.77	3.57
2.60	0.191	0.201	0.205	0.045	11.51	5.54	3.01	6.69
5.20	0.181	0.173	0.185	0.045	17.57	22.81	15.04	18.47
10.40	0.140	0.162	0.158	0.056	49.17	35.99	38.04	37.01
20.83	0.107	0.131	0.132	0.045	61.99	47.35	47.30	52.22
41.67	0.073	0.078	0.080	0.044	82.73	79.91	78.48	80.37
Kontrol	0.214	0.210	0.197	0.042				
IC ₅₀ (µg/mL)					15.43	19.95	19.11	18.16 ±2.40
<i>J. phoenicea</i> /iglice								
2.60	0.125	0.152	0.163	0.049	42.79	22.61	14.39	26.59
5.20	0.072	0.099	0.106	0.051	84.50	63.97	58.93	69.13
10.40	0.055	0.060	0.064	0.047	94.20	90.55	87.15	90.63
20.83	0.058	0.054	0.057	0.048	92.57	94.99	93.07	93.55
41.67	0.059	0.067	0.073	0.058	99.21	93.12	88.73	93.69
83.33	0.064	0.060	0.055	0.052	91.11	93.89	97.69	94.23
166.67	0.061	0.059	0.058	0.052	93.06	95.03	95.21	94.44
Kontrol	0.125	0.152	0.163	0.049				
IC ₅₀ (µg/mL)					2.84	4.11	4.62	4.36 ±0.36



Grafik 8.5. Zavisnost RSC_{DPPH[•]} – radna koncentracija ekstrakta
J. sabina/iglice;
J. sabina/šišarke;
J. phoenicea/iglice

Tabela 8.8. Neutralizacija DPPH[•] radikala
(*J. phoenicea*/šišarke - ekstrakt; BHA; BHT - standardi)

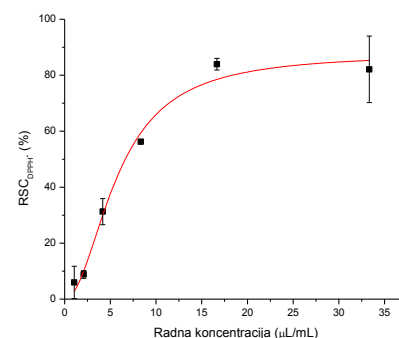
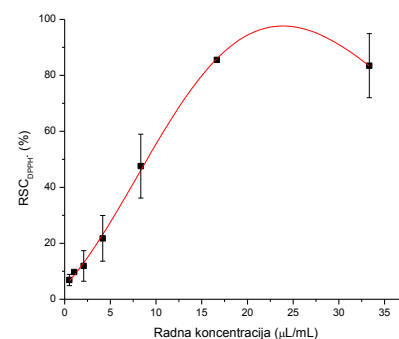
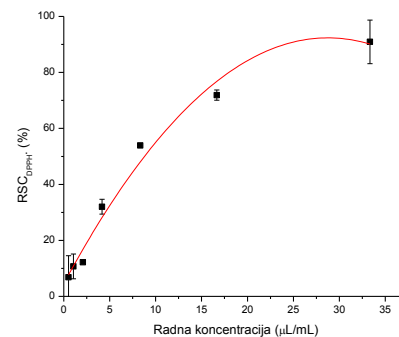
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC _{DPPH[•]} (%)			
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	Srednja vrednost
<i>J. phoenicea</i> /šišarke								
41.67	0.184	0.182	0.182	0.049	15.96	17.15	16.96	16.69
83.33	0.134	0.168	0.159	0.046	45.00	23.69	29.31	32.67
166.67	0.122	0.142	0.132	0.045	51.78	39.10	45.18	45.35
333.33	0.083	0.084	0.113	0.047	76.95	76.85	58.75	70.85
666.67	0.062	0.090	0.056	0.045	89.54	72.05	92.99	84.86
1333.33	0.057	0.057	0.058	0.052	97.15	97.42	96.41	96.99
2666.67	0.069	0.066	0.059	0.049	87.46	89.42	93.95	90.28
Kontrol	0.184	0.182	0.182	0.049				
IC ₅₀ (µg/mL)					121.26	201.48	211.35	206.42 ±6.98
BHA								
2.60	0.231	0.231	0.230	0.045	5.26	5.15	5.92	5.44
5.21	0.197	0.239	0.210	0.048	24.15	2.47	17.25	14.62
10.42	0.162	0.178	0.186	0.048	41.97	34.09	29.72	35.26
20.83	0.087	0.073	0.083	0.044	78.44	85.64	80.28	81.45
41.67	0.065	0.061	0.062	0.046	90.31	92.46	91.89	91.55
83.33	0.058	0.056	0.056	0.045	93.35	94.32	94.23	93.97
166.67	0.056	0.055	0.055	0.046	94.53	95.04	94.99	94.85
Kontrol	0.222	0.224	0.229	0.036				
IC ₅₀ (µg/mL)					11.27	12.35	13.58	12.39 ±1.15
BHT								
2.60	0.224	0.216	0.223	0.044	8.11	12.38	8.64	9.71
5.21	0.194	0.188	0.194	0.055	29.14	32.20	29.42	30.26
10.42	0.115	0.141	0.143	0.046	64.78	51.49	50.52	55.60
20.83	0.064	0.058	0.061	0.045	90.64	93.64	92.17	92.15
41.67	0.054	0.060	0.058	0.045	95.12	91.97	93.00	93.36
83.33	0.059	0.058	0.063	0.046	93.55	94.21	91.33	93.03
166.67	0.058	0.056	0.060	0.045	93.45	94.81	92.78	93.68
Kontrol	0.222	0.224	0.229	0.036				
IC ₅₀ (µg/mL)					7.77	9.26	9.38	8.80 ±0.90



Grafik 8.6. Zavisnost RSC_{DPPH[•]} – radna koncentracija ekstrakta i standarda
J. phoenicea/šišarke
BHA;
BHT

Tabela 8.9. Neutralizacija DPPH[·] radikala
(*J. communis*/iglice; *J. communis*/šišarke; *J. macrocarpa*/iglice – etarska ulja)

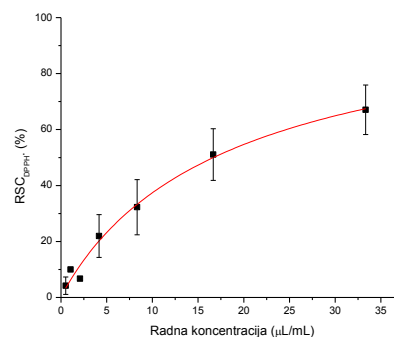
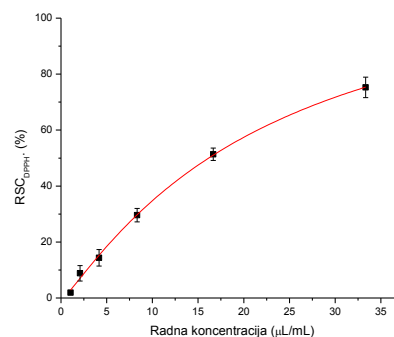
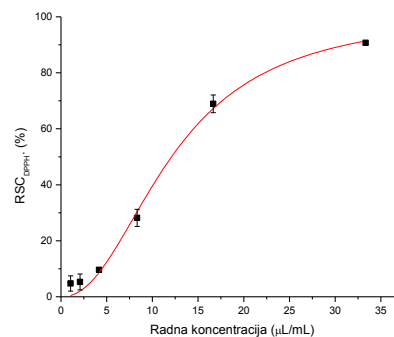
Radna konc. (μL/mL)	Apsorbancija				RSC _{DPPH[·]} (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. communis</i> /iglice								
0.521	0.191	0.213	0.216	0.043	15.65	3.19	1.61	6.81
1.042	0.198	0.221	0.232	0.070	27.17	13.85	7.57	10.71
2.083	0.230	0.225	0.216	0.061	4.18	7.08	12.20	12.20
4.167	0.186	0.195	0.190	0.071	34.59	29.28	32.18	32.02
8.333	0.130	0.149	0.167	0.049	53.92	42.96	32.78	53.92
16.667	0.095	0.099	0.093	0.046	72.44	69.88	73.38	71.90
33.333	0.071	0.090	0.063	0.059	92.89	82.36	97.55	90.93
Kontrola	0.234	0.212	0.211	0.043				
IC ₅₀ (μL/mL)					7.47	8.52	8.30	8.10 ±0.55
<i>J. communis</i> /šišarke								
0.521	0.216	0.222	0.223	0.042	9.22	5.94	5.49	6.88
1.042	0.216	0.215	0.215	0.043	9.51	9.84	9.83	9.73
2.083	0.220	0.216	0.200	0.044	7.67	9.98	18.07	11.90
4.167	0.212	0.185	0.186	0.045	12.35	26.62	26.31	21.76
8.333	0.156	0.160	0.121	0.045	42.23	39.81	60.65	47.56
16.667	0.074	0.072	0.066	0.045	85.18	85.90	89.23	85.54
33.333	0.109	0.081	0.066	0.054	71.14	85.54	93.74	83.47
Kontrola	0.247	0.234	0.230	0.046				
IC ₅₀ (μL/mL)					8.95	8.90	6.93	8.93 ±0.04
<i>J. macrocarpa</i> /iglice								
0.521	0.201	0.211	0.211	0.044	-16.44	-23.98	-23.86	-42.86
1.042	0.171	0.182	0.213	0.049	10.03	1.88	-21.48	5.96
2.083	0.171	0.172	0.174	0.049	10.00	9.19	7.30	8.83
4.167	0.139	0.143	0.152	0.052	35.38	32.27	26.18	31.28
8.333	0.105	0.115	0.116	0.057	64.01	56.56	55.97	56.27
16.667	0.097	0.091	0.093	0.072	81.77	85.95	84.11	83.95
33.333	0.107	0.136	0.111	0.094	90.43	68.48	87.38	82.10
Kontrola	0.159	0.204	0.212	0.057				
IC ₅₀ (μL/mL)					6.17	7.44	7.07	6.89 ±0.65



Grafik 8.7. Zavisnost RSC_{DPPH[·]} – radna koncentracija etarskog ulja
J. communis/iglice
J. communis/šišarke
J. macrocarpa/iglice

Tabela 8.10. Neutralizacija DPPH' radikala
(*J. macrocarpa*/šišarke; *J. excelsa*/iglice; *J. excelsa*/šišarke – etarska ulja)

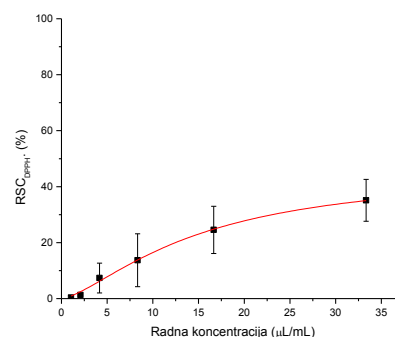
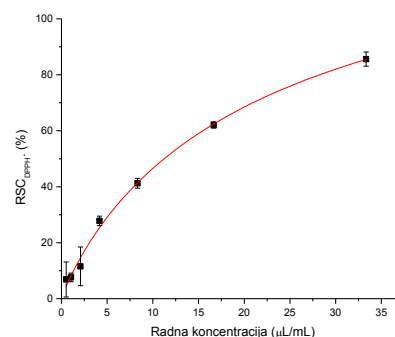
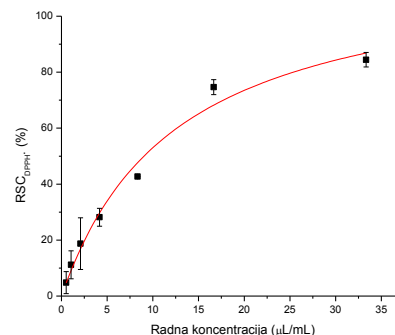
Radna konc. (µL/mL)	Apsorbancija				RSC _{DPPH'} (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. macrocarpa</i> /šišarke								
0.521	0.221	0.223	0.230	0.044	-2.46	-3.06	-7.56	-8.72
1.042	0.220	0.214	0.210	0.050	1.84	5.09	7.32	4.75
2.083	0.208	0.209	0.217	0.047	7.00	6.85	2.05	5.30
4.167	0.200	0.202	0.203	0.045	10.51	9.38	8.89	9.59
8.333	0.166	0.176	0.175	0.048	31.69	26.29	26.51	28.16
16.667	0.099	0.109	0.101	0.049	71.28	65.35	70.19	68.94
33.333	0.070	0.069	0.068	0.053	90.10	90.92	91.06	90.69
Kontrola	0.217	0.220	0.216	0.045				
IC ₅₀ (µL/mL)					11.39	12.91	12.06	12.12 ±0.76
<i>J. excelsa</i> /iglice								
0.521	0.193	0.215	0.217	0.056	12.95	-0.82	-1.77	3.45
1.042	0.199	0.204	0.205	0.044	1.90	-1.22	-1.72	1.90
2.083	0.192	0.190	0.198	0.049	9.48	11.20	5.81	8.83
4.167	0.182	0.174	0.182	0.044	12.91	17.73	12.45	14.36
8.333	0.170	0.155	0.160	0.046	21.63	31.31	27.90	29.60
16.667	0.125	0.118	0.124	0.045	49.82	53.88	50.34	51.35
33.333	0.093	0.083	0.083	0.047	71.03	77.41	77.35	75.27
Kontrola	0.218	0.193	0.197	0.044				
IC ₅₀ (µL/mL)					16.91	14.97	16.43	16.10 ±1.01
<i>J. excelsa</i> /šišarke								
0.521	0.194	0.201	0.205	0.043	6.40	1.98	-0.86	4.19
1.042	0.199	0.222	0.193	0.054	10.00	-3.86	13.87	10.00
2.083	0.161	0.173	0.200	0.050	30.70	23.22	6.71	6.71
4.167	0.158	0.166	0.182	0.043	28.77	23.36	13.68	21.94
8.333	0.134	0.162	0.162	0.044	43.63	26.39	26.76	32.26
16.667	0.108	0.126	0.138	0.045	60.81	49.86	42.45	51.04
33.333	0.089	0.108	0.116	0.051	76.78	64.94	59.48	67.07
Kontrola	0.197	0.209	0.211	0.045				
IC ₅₀ (µL/mL)					10.83	18.50	22.21	20.36 ±2.62



Grafik 8.8. Zavisnost RSC_{DPPH'} – radna koncentracija etarskog ulja
J. macrocarpa/šišarke;
J. excelsa/iglice;
J. excelsa/šišarke

Tabela 8.11. Neutralizacija DPPH' radikala
(*J. sibirica*/iglice; *J. foetidissima*/iglice; *J. foetidissima*/šišarke – etarska ulja)

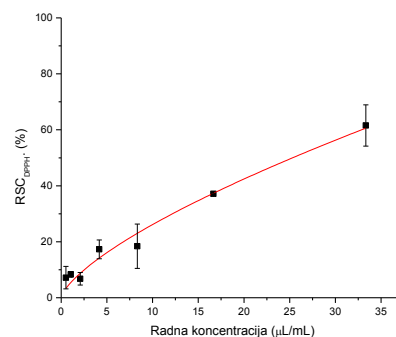
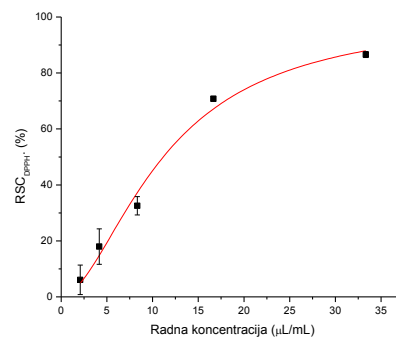
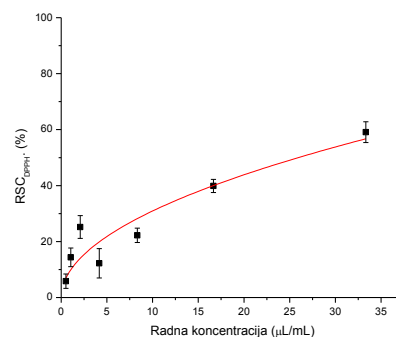
Radna konc. (µL/mL).	Apsorbancija				RSC _{DPPH'} (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. sibirica</i> /iglice								
0.521	0.201	0.203	0.190	0.041	3.08	2.01	9.33	4.81
1.042	0.199	0.183	0.192	0.045	6.26	16.26	11.02	11.18
2.083	0.185	0.159	0.185	0.042	13.46	29.37	13.36	18.73
4.167	0.168	0.177	0.168	0.052	29.97	24.45	30.05	28.16
8.333	0.135	0.134	0.134	0.040	42.66	42.75	42.89	42.70
16.667	0.092	0.088	0.097	0.051	74.87	77.25	71.87	74.66
33.333	0.071	0.078	0.071	0.047	85.96	81.48	85.94	84.46
Kontrola	0.208	0.211	0.212	0.045	8.89	8.73	8.49	
IC ₅₀ (µL/mL)					8.89	8.73	8.49	8.70 ±0.20
<i>J. foetidissima</i> /iglice								
0.521	0.200	0.181	0.195	0.046	1.86	13.89	4.86	6.87
1.042	0.191	0.187	0.189	0.044	6.00	9.03	7.78	7.61
2.083	0.184	0.193	0.172	0.044	10.95	4.93	18.73	11.54
4.167	0.169	0.166	0.164	0.053	25.95	28.22	29.26	27.81
8.333	0.138	0.137	0.133	0.044	40.06	40.40	43.24	41.23
16.667	0.110	0.106	0.108	0.048	60.94	63.22	62.02	62.06
33.333	0.084	0.079	0.076	0.057	82.81	86.19	87.78	85.59
Kontrola	0.216	0.209	0.182	0.045				
IC ₅₀ (µL/mL)					11.46	11.47	10.71	11.21 ±0.44
<i>J. foetidissima</i> /šišarke								
0.521	0.179	0.181	0.181	0.043	-8.72	-10.21	-10.32	-9.75
1.042	0.168	0.193	0.175	0.044	0.39	-19.39	-4.86	0.39
2.083	0.168	0.175	0.178	0.045	1.29	-4.01	-6.43	1.29
4.167	0.156	0.169	0.163	0.047	12.74	2.09	7.21	7.35
8.333	0.143	0.163	0.163	0.049	24.61	8.05	8.47	13.71
16.667	0.136	0.157	0.149	0.053	33.54	16.80	23.31	24.55
33.333	0.160	0.150	0.169	0.079	34.49	42.90	27.98	35.12
Kontrola	0.167	0.164	0.175	0.044				
IC ₅₀ (µL/mL)								>33.333



Grafik 8.9. Zavisnost RSC_{DPPH'} – radna koncentracija etarskog ulja
J. sibirica/iglice;
J. foetidissima/iglice;
J. foetidissima/šišarke

Tabela 8.12. Neutralizacija DPPH[•] radikala
(*J. oxycedrus*/iglice; *J. oxycedrus*/šišarke; *J. sabina*/iglice – etarska ulja)

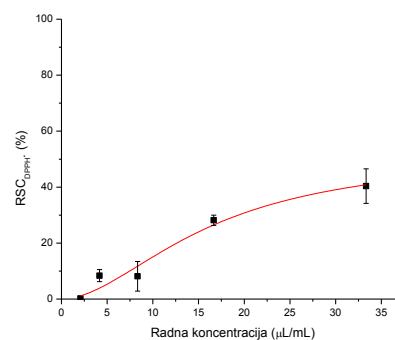
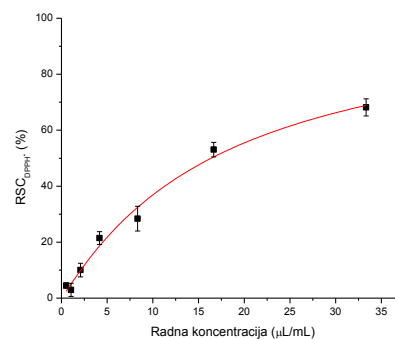
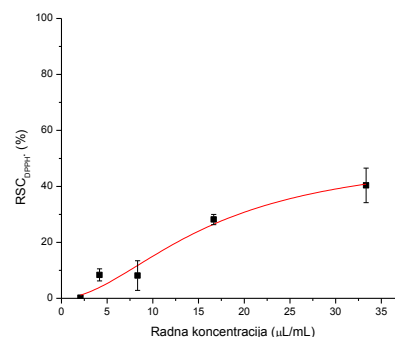
Radna konc. (μL/mL)	Apsorbancija				RSC _{DPPH[•]} (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. oxycedrus</i> /iglice								
0.521	0.178	0.171	0.172	0.043	2.97	7.85	6.73	5.85
1.042	0.160	0.168	0.167	0.046	18.18	11.95	13.02	14.39
2.083	0.169	0.161	0.158	0.058	20.75	26.12	28.70	25.19
4.167	0.163	0.171	0.173	0.046	15.94	9.72	8.51	12.23
8.333	0.154	0.154	0.159	0.048	24.03	24.02	20.41	22.22
16.667	0.131	0.138	0.136	0.051	42.39	37.76	39.42	39.86
33.333	0.131	0.137	0.127	0.075	59.80	55.06	62.41	59.09
Kontrola	0.169	0.186	0.203	0.047				
IC ₅₀ (μL/mL)					24.32	27.78	24.52	25.54 ±1.94
<i>J. oxycedrus</i> /šišarke								
0.521	0.183	0.171	0.172	0.048	-21.68	-11.12	-11.92	-14.91
1.042	0.166	0.171	0.168	0.047	-7.30	-12.01	-9.74	-9.68
2.083	0.152	0.160	0.149	0.049	7.50	0.24	10.51	6.09
4.167	0.144	0.153	0.140	0.055	19.21	11.08	23.59	17.96
8.333	0.127	0.126	0.120	0.050	29.97	31.44	36.26	32.56
16.667	0.103	0.101	0.097	0.070	70.20	71.41	75.46	70.81
33.333	0.092	0.090	0.092	0.076	85.97	87.79	85.98	86.58
Kontrola	0.179	0.180	0.182	0.069				
IC ₅₀ (μL/mL)					11.56	11.26	12.79	11.87 ±0.81
<i>J. sabina</i> /iglice								
0.521	0.154	0.161	0.174	0.045	10.03	4.34	-6.86	7.18
1.042	0.157	0.155	0.168	0.045	7.65	9.04	-1.78	8.34
2.083	0.176	0.158	0.161	0.047	-6.69	8.38	5.20	6.79
4.167	0.146	0.151	0.153	0.050	21.04	16.30	14.53	17.29
8.333	0.140	0.158	0.154	0.048	24.02	9.32	12.80	18.41
16.667	0.110	0.129	0.129	0.053	52.43	36.99	37.30	37.14
33.333	0.098	0.114	0.114	0.062	70.08	57.05	57.50	61.55
Kontrola	0.157	0.173	0.174	0.047				
IC ₅₀ (μL/mL)					19.96	26.99	27.08	27.04 ±0.06



Grafik 8.10. Zavisnost RSC_{DPPH[•]} – radna koncentracija etarskog ulja
J. oxycedrus/iglice;
J. oxycedrus/šišarke;
J. sabina/iglice

Tabela 8.13. Neutralizacija DPPH' radikala
(*J. sabina*/šišarke; *J. phoenicea*/iglice; *J. phoenicea*/šišarke – etarska ulja)

Radna konc. (μL/mL)	Apsorbancija				RSC _{DPPH'} (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. sabina</i> /šišarke								
0.521	0.180	0.175	0.16	0.046	-10.57	-5.94	-0.85	-5.79
1.042	0.173	0.177	0.17	0.050	-2.22	-4.90	-6.91	-4.68
2.083	0.171	0.170	0.17	0.049	-0.37	0.22	-5.89	0.22
4.167	0.163	0.164	0.15	0.051	7.76	6.57	10.76	8.36
8.333	0.171	0.160	0.15	0.052	2.00	10.96	11.45	8.14
16.667	0.153	0.152	0.15	0.067	28.44	29.86	26.20	28.17
33.333	0.150	0.142	0.15	0.077	39.65	46.86	34.60	40.37
Kontrola	0.174	0.170	0.16	0.047				
IC ₅₀ (μL/mL)								>33.333
<i>J. phoenicea</i> /iglice								
0.521	0.173	0.184	0.171	0.044	3.87	-4.05	5.14	4.51
1.042	0.173	0.177	0.171	0.044	3.30	0.46	5.11	2.95
2.083	0.165	0.168	0.161	0.044	9.64	7.84	12.63	10.04
4.167	0.153	0.154	0.149	0.047	20.55	19.79	24.05	21.46
8.333	0.138	0.149	0.139	0.046	31.11	23.28	30.83	28.41
16.667	0.116	0.112	0.109	0.050	50.43	53.15	55.63	53.07
33.333	0.094	0.095	0.101	0.054	70.17	69.68	64.66	68.17
Kontrola	0.178	0.189	0.180	0.048				
IC ₅₀ (μL/mL)					16.47	16.8	15.56	16.28 ±0.64
<i>J. phoenicea</i> /šišarke								
0.521	0.219	0.218	0.227	0.046	-10.37	-9.77	-15.15	-11.76
1.042	0.209	0.210	0.201	0.055	1.58	0.85	6.82	3.08
2.083	0.206	0.204	0.198	0.056	4.19	5.64	9.11	6.31
4.167	0.202	0.196	0.225	0.046	0.89	4.28	-13.91	2.59
8.333	0.187	0.190	0.198	0.063	21.30	19.28	14.23	18.27
16.667	0.154	0.166	0.171	0.047	31.39	24.01	21.00	25.47
33.333	0.096	0.108	0.110	0.060	77.20	69.34	68.10	71.54
Kontrola	0.216	0.221	0.230	0.066	23.13	25.76	26.83	
IC ₅₀ (μL/mL)					23.13	25.76	26.83	25.24 ±1.90



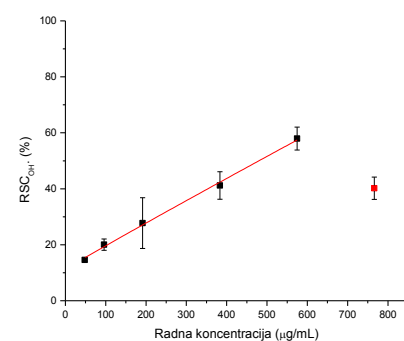
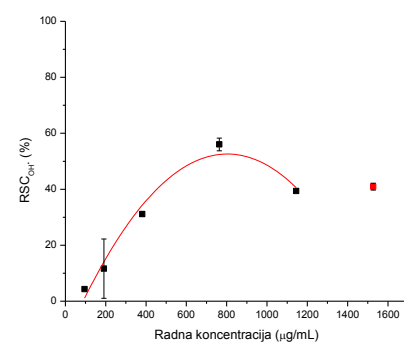
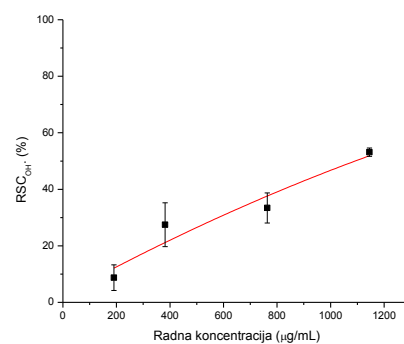
Grafik 8.11. Zavisnost RSC_{DPPH'} – radna koncentracija etarskog ulja
J. sabina/šišarke;
J. phoenicea/iglice;
J. phoenicea/šišarke

8.2.2. Kapacitet „hvatanja“ HO[•] radikala

Tabela 8.13. Kapacitet „hvatanja“ OH[•] radikala

(*J. communis*/iglice; *J. communis*/šišarke; *J. macrocarpa*/iglice - ekstrakt)

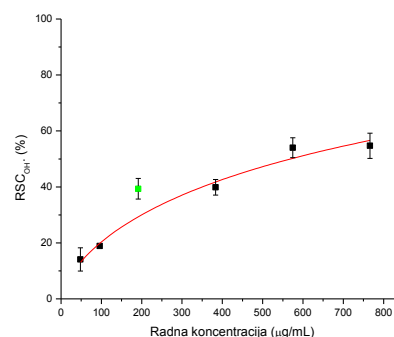
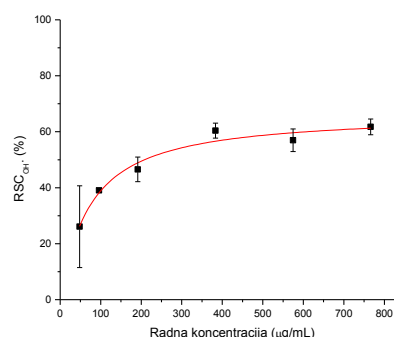
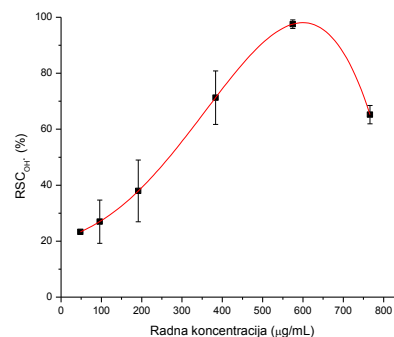
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC _{OH[•]} (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. communis</i> /iglice								
95.42	0.208	0.209	0.203	0.047	24.74	24.44	27.21	25.46
190.84	0.258	0.240	0.243	0.052	3.57	11.98	10.68	8.74
381.68	0.216	0.246	0.244	0.080	36.36	22.35	23.70	27.47
763.36	0.289	0.300	0.312	0.158	38.68	33.48	28.06	33.41
1145.04	0.415	0.417	0.411	0.314	52.67	51.93	54.78	53.12
1526.72	0.923	0.512	0.530	0.363	-161.73	30.37	21.67	-36.56
Kontrola	0.247	0.239	0.270	0.038				
IC ₅₀ (µg/mL)					939.58	1119.98	1042.88	1034.15 ±90.52
<i>J. communis</i> /šišarke								
95.42	0.211	0.253	0.227	0.040	4.31	-18.90	-4.43	4.31
190.84	0.182	0.220	0.202	0.043	22.50	1.28	11.12	11.63
381.68	0.171	0.168	0.169	0.046	30.14	31.79	31.54	31.16
763.36	0.170	0.172	0.164	0.090	55.18	54.28	58.57	56.01
1145.04	0.176	0.174	0.175	0.066	38.58	39.38	38.80	39.38
1526.72	0.182	0.188	0.185	0.077	41.82	38.34	40.09	40.95
Kontrola	0.223	0.201	0.228	0.038				
IC ₅₀ (µg/mL)					650.56	606.22	600.62	619.13 ±27.36
<i>J. macrocarpa</i> /iglice								
47.89	0.289	0.287	0.520	0.048	14.19	15.02	-68.08	14.60
95.79	0.283	0.277	0.271	0.052	18.00	20.11	22.06	20.06
191.57	0.291	0.247	0.247	0.059	17.26	32.85	33.14	27.75
383.14	0.225	0.244	0.302	0.069	44.67	37.69	17.03	41.18
574.71	0.251	0.237	0.228	0.120	53.65	58.36	61.80	57.94
766.28	0.264	0.387	0.278	0.088	37.38	-6.58	32.35	40.21
Kontrola	0.307	0.340	0.318	0.048				
IC ₅₀ (µg/mL)					450.58	483.83	513.26	482.56 ±31.36



Grafik 8.11. Zavisnost RSC_{OH[•]} – radna koncentracija ekstrakta
J. communis/iglice
J. communis/šišarke
J. macrocarpa/iglice

Tabela 8.14. Kapacitet „hvatanja“ OH[•] radikala
(*J. macrocarpa*/šišarke; *J. excelsa*/iglice; *J. excelsa*/šišarke - ekstrakt)

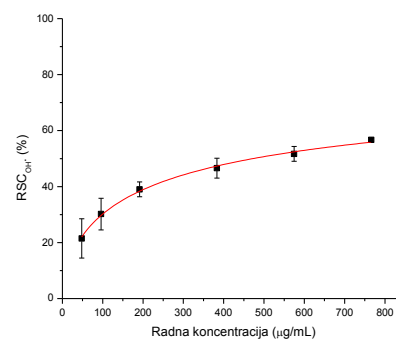
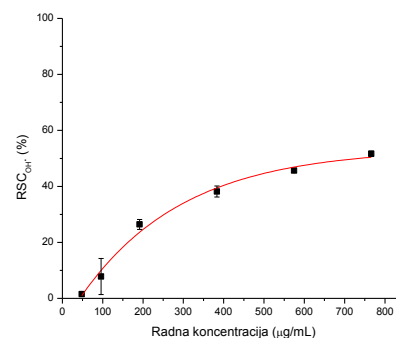
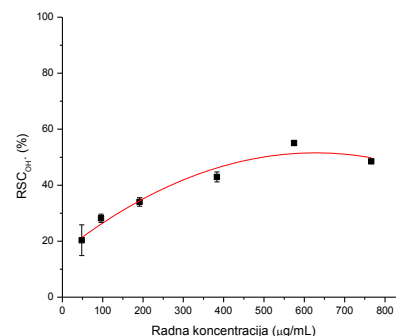
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC _{OH[•]} (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. macrocarpa</i> /šišarke								
47.89	0.357	0.292	0.288	0.049	23.34	39.52	40.50	23.34
95.79	0.376	0.348	0.314	0.052	19.53	26.36	34.98	26.96
191.57	0.369	0.306	0.741	0.088	30.13	45.75	-62.48	37.94
383.14	0.185	0.258	0.242	0.113	82.08	63.91	67.88	71.29
574.71	0.226	0.064	0.055	0.050	56.15	96.47	98.64	97.56
766.28	0.232	0.230	0.251	0.102	67.52	68.08	62.90	65.21
Kontrola	0.377	0.540	0.432	0.047				
IC ₅₀ (µg/mL)					236.93	239.87	174.23	238.40 ±2.08
<i>J. excelsa</i> /iglice								
47.89	0.253	0.319	0.352	0.053	42.02	22.99	13.30	26.10
95.79	0.264	0.236	0.219	0.054	39.06	47.01	52.09	39.06
191.57	0.240	0.227	0.257	0.057	47.02	50.71	41.94	46.56
383.14	0.206	0.194	0.219	0.076	62.32	65.88	58.52	60.42
574.71	0.203	0.222	0.231	0.070	61.40	56.04	53.43	56.96
766.28	0.219	0.216	0.201	0.080	59.73	60.57	64.94	61.74
Kontrola	0.374	0.423	0.378	0.047				
IC ₅₀ (µg/mL)					196.81	185.90	278.01	191.36 ±7.71
<i>J. excelsa</i> /šišarke								
47.89	0.271	0.250	0.261	0.049	10.08	18.38	13.79	14.09
95.79	0.306	0.457	0.256	0.056	-1.35	-62.14	18.92	18.92
191.57	0.243	0.227	0.243	0.088	37.13	43.58	37.29	39.33
383.14	0.216	0.202	0.210	0.061	37.23	42.76	39.64	39.87
574.71	0.343	0.199	0.212	0.092	-1.69	56.52	51.50	54.01
766.28	0.191	0.180	0.202	0.079	54.86	59.14	50.12	54.71
Kontrola	0.303	0.294	0.294	0.050				
IC ₅₀ (µg/mL)					617.84	408.11	681.18	649.51 ±44.79



Grafik 8.12. Zavisnost RSC_{OH[•]} – radna koncentracija ekstrakta
J. macrocarpa/šišarke;
J. excelsa/iglice;
J. excelsa/šišarke

Tabela 8.15. Kapacitet „hvatanja“ OH[•] radikala
(*J. sibirica*/iglice; *J. sibirica*/šišarke; *J. foetidissima*/iglice - ekstrakt)

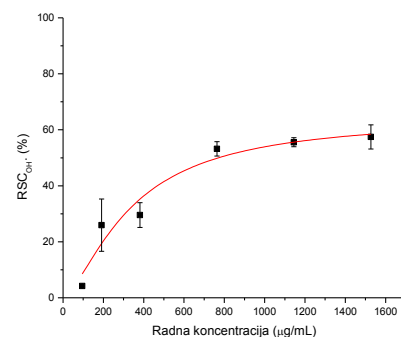
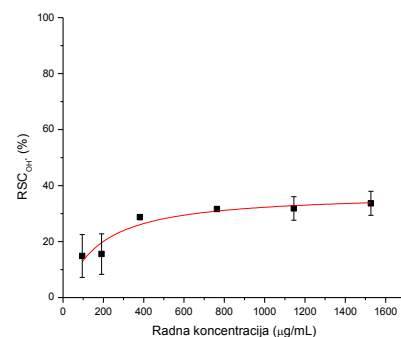
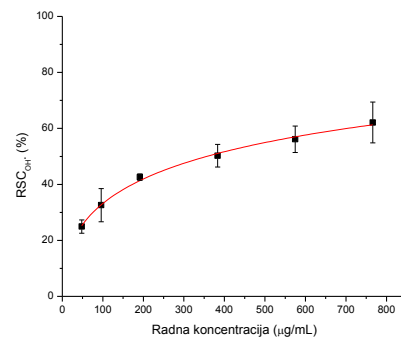
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC _{OH[•]} (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. sibirica</i> /iglice								
47.89	0.300	0.268	0.285	0.050	14.95	25.90	20.17	20.34
95.79	0.271	0.264	0.264	0.055	26.50	28.99	29.07	28.19
191.57	0.255	0.264	0.259	0.065	35.41	32.41	34.27	34.03
383.14	0.257	0.265	0.267	0.095	44.93	42.35	41.55	42.94
574.71	0.283	0.278	0.281	0.148	54.20	55.91	55.03	55.05
766.28	0.319	0.319	0.320	0.167	48.72	48.46	48.33	48.50
Kontrola	0.429	0.334	0.314	0.064				
IC ₅₀ (µg/mL)					435.74	485.65	524.41	481.93 ±44.45
<i>J. sibirica</i> /šišarke								
47.89	0.307	0.310	0.316	0.050	2.18	0.92	-1.46	1.55
95.79	0.276	0.285	0.308	0.048	13.09	9.69	0.65	7.81
191.57	0.240	0.249	0.243	0.051	27.83	24.43	27.01	26.42
383.14	0.219	0.228	0.219	0.060	39.21	35.93	39.42	38.19
574.71	0.213	0.210	0.212	0.069	45.15	46.41	45.39	45.65
766.28	0.210	0.213	0.215	0.086	52.67	51.52	50.83	51.67
Kontrola	0.349	0.286	0.306	0.052				
IC ₅₀ (µg/mL)					697.23	720.72	727.72	715.22 ±15.97
<i>J. foetidissima</i> /iglice								
47.89	0.409	0.397	0.353	0.052	16.10	18.97	29.39	21.49
95.79	0.337	0.335	0.371	0.056	34.17	34.65	26.19	30.18
191.57	0.323	0.328	0.306	0.059	38.13	36.93	41.99	39.02
383.14	0.337	0.289	0.311	0.072	37.76	49.11	44.09	46.60
574.71	0.302	0.281	0.286	0.084	48.73	53.82	52.50	51.68
766.28	0.286	0.287	0.282	0.101	56.58	56.13	57.31	56.67
Kontrola	0.443	0.479	0.515	0.053				
IC ₅₀ (µg/mL)					469.96	440.07	493.34	467.79 ±26.67



Grafik 8.13. Zavisnost RSC_{OH[•]} – radna koncentracija ekstrakta
J. sibirica/iglice;
J. sibirica/šišarke;
J. foetidissima/iglice

Tabela 8.16. Kapacitet „hvatanja“ OH[•] radikala
(*J. foetidissima*/šišarke; *J. oxycedrus*/iglice; *J. oxycedrus*/šišarke - ekstrakt)

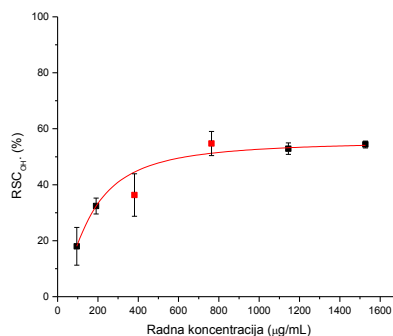
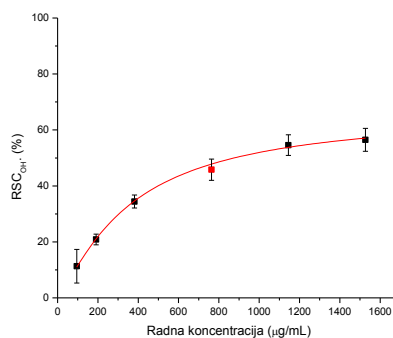
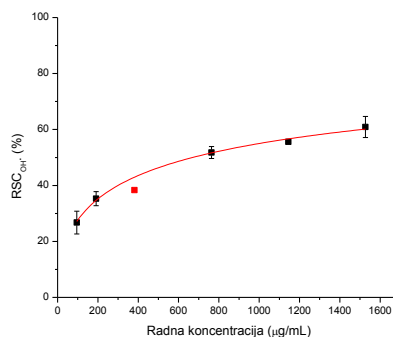
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC _{OH[•]} (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. foetidissima</i> /šišarke								
47.89	0.421	0.414	0.399	0.056	22.91	24.34	27.57	24.94
95.79	0.408	0.354	0.368	0.057	25.95	37.43	34.36	32.58
191.57	0.331	0.345	0.338	0.070	44.86	41.81	43.41	42.61
383.14	0.305	0.329	0.291	0.072	50.88	45.89	53.89	50.22
574.71	0.307	0.223	0.275	0.083	52.79	70.35	59.45	56.12
766.28	0.282	0.310	0.241	0.098	61.27	55.30	69.80	62.12
Kontrol	0.523	0.485	0.566	0.051				
IC ₅₀ (µg/mL)					427.93	404.69	301.83	416.31 ±16.43
<i>J. oxycedrus</i> /iglice								
95.42	0.361	0.281	0.311	0.057	-8.42	20.28	9.45	14.86
190.84	0.321	0.287	0.285	0.060	7.19	19.49	19.95	15.55
381.68	0.275	0.270	0.272	0.072	27.81	29.57	28.86	28.75
763.36	0.284	0.284	0.280	0.090	31.25	30.99	32.64	31.63
1145.04	0.311	0.334	0.316	0.129	35.15	27.08	33.29	31.84
1526.72	0.342	0.355	0.331	0.156	33.76	29.34	37.90	33.66
Kontrol	0.386	0.315	0.290	0.049				
IC ₅₀ (µg/mL)					> 1526.72			
<i>J. oxycedrus</i> /šišarke								
95.42	0.241	0.275	0.263	0.052	25.25	11.94	16.78	17.99
190.84	0.227	0.231	0.241	0.062	34.70	33.23	29.24	32.39
381.68	0.202	0.231	0.239	0.063	44.91	33.51	30.54	36.32
763.36	0.203	0.196	0.211	0.089	54.85	57.77	51.67	54.72
1145.04	0.192	0.198	0.205	0.082	56.55	54.35	51.44	52.89
1526.72	0.205	0.211	0.207	0.092	55.50	53.05	54.58	54.38
Kontrol	0.316	0.317	0.300	0.058				
IC ₅₀ (µg/mL)					653.54	695.17	970.24	674.36 ±29.44



Grafik 8.14. Zavisnost RSC_{OH[•]} – radna koncentracija ekstrakta
J. foetidissima/šišarke;
J. oxycedrus/iglice;
J. oxycedrus/šišarke

Tabela 8.17. Kapacitet „hvatanja“ OH[•] radikala
(*J. sabina*/iglice; *J. sabina*/šišarke; *J. phoenicea*/iglice - ekstrakt)

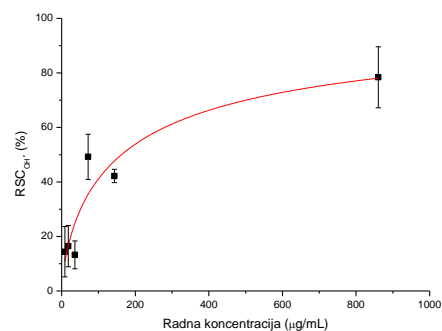
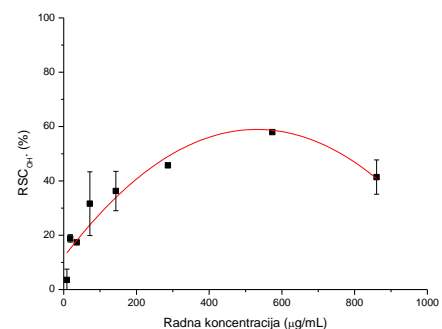
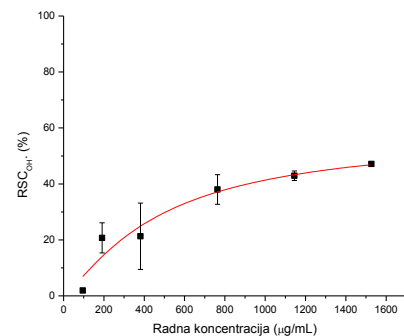
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC _{OH[•]} (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. sabina</i> /iglice								
95.42	0.283	0.295	0.269	0.052	26.58	22.74	30.89	26.74
190.84	0.264	0.253	0.236	0.055	33.49	37.03	42.17	35.26
381.68	0.255	0.255	0.239	0.062	38.47	38.34	43.54	38.34
763.36	0.232	0.224	0.237	0.080	51.37	54.06	49.85	51.76
1145.04	0.236	0.242	0.227	0.087	52.75	50.60	55.58	55.58
1526.72	0.247	0.248	0.227	0.118	58.80	58.59	65.23	60.88
Kontrola	0.384	0.351	0.362	0.052				
IC ₅₀ (µg/mL)					703.88	665.96	615.61	661.81 ±44.28
<i>J. sabina</i> /šišarke								
95.42	0.236	0.212	0.221	0.047	4.84	16.72	12.36	11.31
190.84	0.204	0.201	0.209	0.048	21.18	22.58	18.84	20.87
381.68	0.184	0.179	0.175	0.049	32.06	34.55	36.68	34.43
763.36	0.167	0.163	0.157	0.055	43.13	45.50	48.49	45.71
1145.04	0.163	0.150	0.151	0.065	50.31	56.88	56.55	54.58
1526.72	0.170	0.159	0.154	0.075	51.94	57.48	59.98	56.47
Kontrola	0.239	0.250	0.244	0.046				
IC ₅₀ (µg/mL)					1231.73	883.11	791.16	837.14 ±65.02
<i>J. phoenicea</i> /iglice								
95.42	0.241	0.275	0.263	0.052	25.25	11.94	16.78	17.99
190.84	0.227	0.231	0.241	0.062	34.70	33.23	29.24	32.39
381.68	0.202	0.231	0.239	0.063	44.91	33.51	30.54	36.32
763.36	0.203	0.196	0.211	0.089	54.85	57.77	51.67	54.72
1145.04	0.192	0.198	0.205	0.082	56.55	54.35	51.44	52.89
1526.72	0.205	0.211	0.207	0.092	55.50	53.05	54.58	54.38
Kontrola	0.316	0.317	0.300	0.058				
IC ₅₀ (µg/mL)					653.54	695.17	970.24	674.36 ±29.44



Grafik 8.15. Zavisnost RSC_{OH[•]} – radna koncentracija ekstrakta
J. sabina/iglice;
J. sabina/šišarke;
J. phoenicea/iglice

Tabela 8.18. Kapacitet „hvatanja“ OH[•] radikala
(*J. phoenicea*/šišarke; *J. sabina*/šišarke; *J. phoenicea*/glice – ekstrakt i standardi)

Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC _{OH[•]} (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. phoenicea</i> /šišarke								
95.42	0.262	0.273	0.254	0.047	-1.95	-7.07	1.92	1.92
190.84	0.229	0.220	0.207	0.051	15.59	20.22	26.35	20.72
381.68	0.207	0.203	0.248	0.054	27.25	28.99	7.68	21.31
763.36	0.193	0.172	0.189	0.054	34.03	44.00	36.02	38.02
1145.04	0.174	0.173	0.180	0.055	43.75	44.03	40.95	42.91
1526.72	0.175	0.173	0.174	0.062	46.85	47.56	47.08	47.16
Kontrola	0.270	0.275	0.228	0.047				
IC ₅₀ (µg/mL)	> 1526.72							
<i>BHA</i>								
8.95	0.457	0.535	0.434	0.051	0.73	-18.34	6.36	3.55
17.90	0.523	0.382	0.374	0.046	-16.63	17.85	19.80	18.83
35.85	0.558	0.535	0.39	0.052	-23.72	-18.09	17.36	17.36
71.70	0.383	0.303	0.297	0.048	18.09	37.65	39.12	31.62
143.40	0.343	0.3	0.286	0.049	28.12	38.63	42.05	36.27
286.81	0.273	0.273	0.273	0.051	45.72	45.72	45.72	45.72
573.61	0.272	0.272	0.272	0.100	57.95	57.95	57.95	57.95
860.42	0.327	0.278	0.288	0.058	34.23	46.21	43.77	41.40
Kontrola	0.44	0.496	0.412	0.040				
IC ₅₀ (µg/mL)					322.81	302.7	277.64	301.05 ±22.63
<i>BHT</i>								
8.95	0.479	0.413	0.416	0.091	3.72	20.10	19.35	14.39
17.90	0.456	0.425	0.486	0.119	16.38	24.07	8.93	16.46
35.85	0.420	0.379	0.397	0.049	7.94	18.11	13.65	13.23
71.70	0.458	0.398	0.403	0.215	39.70	54.59	53.35	49.21
143.40	0.457	0.404	0.390	0.164	27.30	40.45	43.92	42.18
286.81	0.469	0.452	0.456	0.052	-3.47	0.74	-0.25	-0.99
573.61	0.447	0.475	0.455	0.049	1.24	-5.71	-0.74	-1.74
860.42	0.489	0.415	0.497	0.380	72.95	91.32	70.97	78.41
Kontrola	0.430	0.461	0.437	0.040				
IC ₅₀ (µg/mL)					116.41	156.84	140.17	148.51 ±11.79



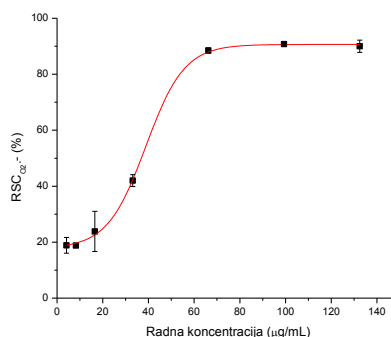
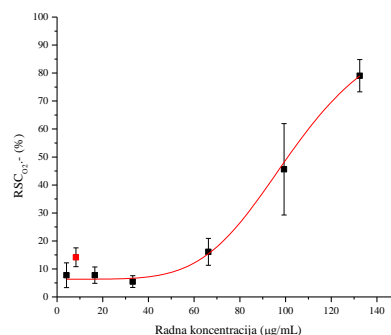
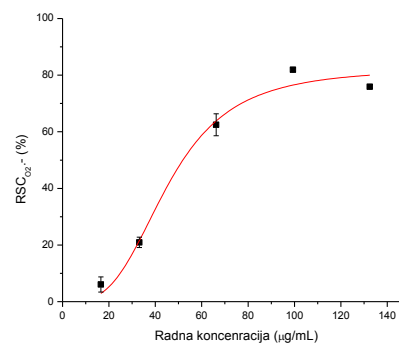
Grafik 8.16. Zavisnost RSC_{OH[•]} – radna koncentracija ekstrakta/standarda
J. phoenicea/šišarke
BHA;
BHT

8.2.3. Kapacitet „hvatanja“ $O_2^{\cdot-}$ radikala

Tabela 8.19. Kapacitet „hvatanja“ $O_2^{\cdot-}$ radikala

(*J. communis*/iglice; *J. communis*/šišarke; *J. macrocarpa*/iglice - ekstrakt)

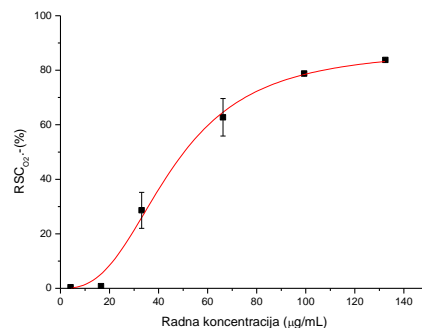
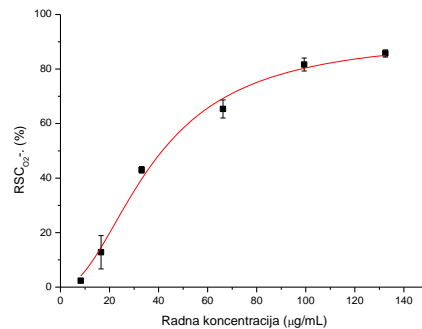
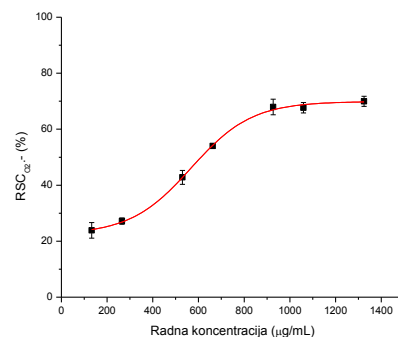
Radna konc. ($\mu\text{g/mL}$)	Apsorbancija				RSC $_{O_2^{\cdot-}}$ (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. communis</i> /iglice								
4.1391	0.404	0.402	0.394	0.006	-6.42	-5.88	-3.74	-5.35
8.2781	0.400	0.421	0.419	0.007	-5.08	-10.70	-10.16	-8.65
16.5563	0.366	0.346	0.354	0.004	3.21	8.56	6.42	6.06
33.1126	0.304	0.301	0.291	0.003	19.52	20.32	22.99	20.94
66.2252	0.158	0.146	0.129	0.004	58.82	62.03	66.58	62.48
99.3377	0.070	0.074	0.074	0.005	82.62	81.55	81.55	81.91
132.450	0.094	0.092	0.090	0.002	75.40	75.94	76.47	75.94
Kontrol	0.370	0.382	0.370					
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)					55.54	53.82	50.04	53.13 \pm 2.81
<i>J. communis</i> /šišarke								
4.1391	0.416	0.387	0.383	0.020	2.70	9.83	10.81	7.78
8.2781	0.381	0.358	0.357	0.016	10.32	15.97	16.22	14.17
16.5563	0.381	0.398	0.404	0.019	11.06	6.88	5.41	7.78
33.1126	0.408	0.397	0.391	0.014	3.19	5.90	7.37	5.49
66.2252	0.330	0.369	0.352	0.009	21.13	11.55	15.72	16.13
99.3377	0.306	0.193	0.189	0.008	26.78	54.55	55.53	45.62
132.450	0.078	0.093	0.124	0.013	84.03	80.34	72.73	79.03
Kontrol	0.419	0.402	0.401					
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)					114.36	96.47	94.43	101.75 \pm 10.97
<i>J. macrocarpa</i> /iglice								
4.1391	0.456	0.441	0.467	0.079	18.57	21.81	16.20	18.86
8.2781	0.454	0.454	0.454	0.078	18.79	18.79	18.79	18.79
16.5563	0.396	0.422	0.462	0.074	30.45	24.84	16.20	23.83
33.1126	0.338	0.354	0.336	0.074	42.98	39.52	43.41	41.97
66.2252	0.129	0.132	0.124	0.075	88.34	87.69	89.42	88.48
99.3377	0.116	0.116	0.115	0.073	90.71	90.71	90.93	90.78
132.450	0.117	0.135	0.118	0.077	91.36	87.47	91.14	89.99
Kontrol	0.450	0.468	0.471					
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)					36.12	38.02	33.46	35.87 \pm 2.29



Grafik 8.17. Zavisnost RSC $_{O_2^{\cdot-}}$ - radna koncentracija ekstrakata
J. communis/iglice
J. communis/šišarke
J. macrocarpa/iglice

Tabela 8.20. Kapacitet „hvatanja“ O₂^{•-} radikala
(*J. macrocarpa*/šišarke; *J. excelsa*/iglice; *J. excelsa*/šišarke - ekstrakt)

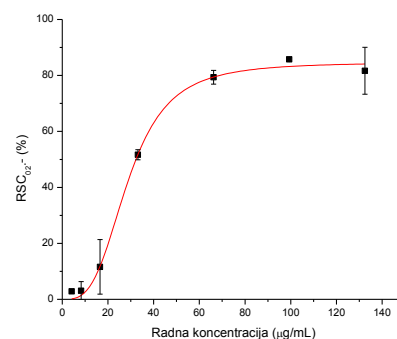
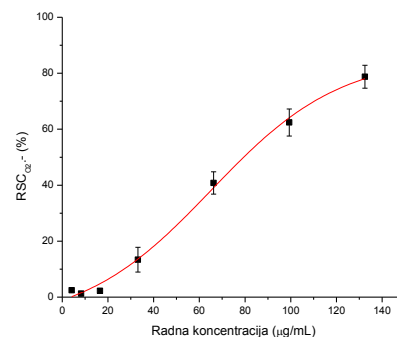
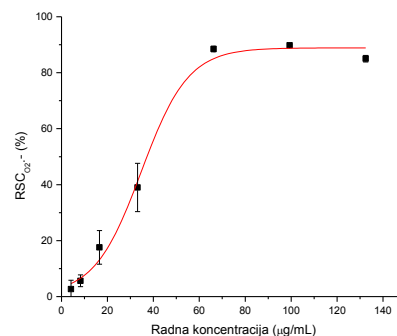
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC _{O₂^{•-}} (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. macrocarpa</i> /šišarke								
132.450	0.289	0.277	0.269	0.002	20.94	24.24	26.45	23.88
264.900	0.261	0.268	0.261	-0.001	27.82	25.90	27.82	27.18
529.801	0.218	0.211	0.200	0.002	40.50	42.42	45.45	42.79
662.251	0.166	0.171	0.170	0.002	54.82	53.44	53.72	53.99
927.152	0.129	0.117	0.109	0.002	65.01	68.32	70.52	67.95
1059.60	0.116	0.126	0.113	0.001	68.32	65.56	69.15	67.68
1324.50	0.120	0.107	0.115	0.005	68.32	71.90	69.70	69.97
Kontrol	0.364	0.371	0.355					
IC ₅₀ (µg/mL)					619.57	618.97	596.35	611.63 ±13.24
<i>J. excelsa</i> /iglice								
4.1391	0.226	0.386	0.134	0.226	39.68	-2.65	64.02	33.69
8.2781	0.369	0.384	0.393	0.369	2.38	-1.59	-3.97	2.38
16.5563	0.304	0.332	0.350	0.304	19.31	11.90	7.14	12.79
33.1126	0.210	0.219	0.214	0.210	44.18	41.80	43.12	43.03
66.2252	0.117	0.141	0.135	0.117	69.05	62.70	64.29	65.34
99.3377	0.072	0.062	0.080	0.072	81.48	84.13	79.37	81.66
132.450	0.057	0.052	0.062	0.057	85.71	87.04	84.39	85.71
Kontrol	0.359	0.387	0.387					
IC ₅₀ (µg/mL)					38.49	44.07	41.79	41.45 ±2.81
<i>J. excelsa</i> /šišarke								
4.1391	0.408	0.376	0.377	0.408	-8.02	0.53	0.27	0.40
8.2781	0.397	0.399	0.401	0.397	-4.28	-4.81	-5.35	-4.81
16.5563	0.402	0.379	0.387	0.402	-5.35	0.80	-1.34	0.80
33.1126	0.251	0.271	0.300	0.251	34.76	29.41	21.66	28.61
66.2252	0.121	0.172	0.152	0.121	70.05	56.42	61.76	62.75
99.3377	0.089	0.091	0.085	0.089	78.61	78.07	79.68	78.79
132.450	0.070	0.070	0.069	0.070	83.69	83.69	83.96	83.78
Kontrol	0.371	0.370	0.381					
IC ₅₀ (µg/mL)					43.40	54.90	53.89	54.40 ±0.71



Grafik 8.18. Zavisnost RSC_{O₂^{•-}} - radna koncentracija ekstrakata
J. macrocarpa/šišarke;
J. excelsa/iglice;
J. excelsa/šišarke

Tabela 8.21. Kapacitet „hvatanja“ O₂⁻ radikala
(*J. sibirica*/iglice; *J. sibirica*/šišarke; *J. foetidissima*/iglice - ekstrakt)

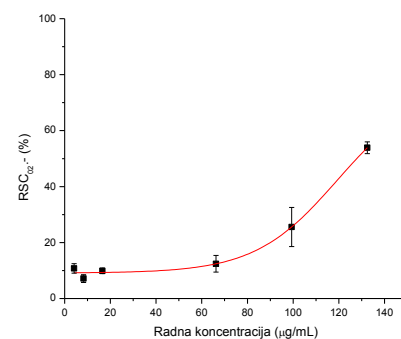
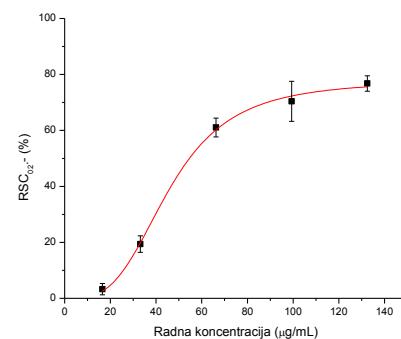
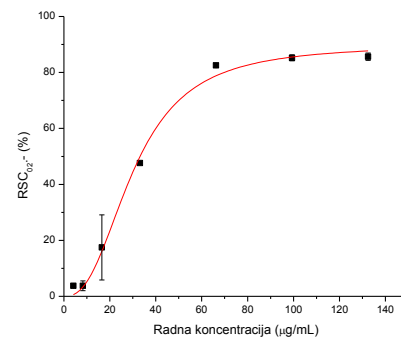
Radna konc. (µg/mL).	Apsorbancija				RSC _{O₂⁻} (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. sibirica</i> /iglice								
4.1391	0.426	0.425	0.402	0.004	0.71	0.94	6.35	2.67
8.2781	0.395	0.412	0.408	0.004	8.00	4.00	4.94	5.65
16.5563	0.345	0.333	0.382	0.003	19.53	22.35	10.82	17.57
33.1126	0.222	0.276	0.292	0.004	48.71	36.00	32.24	38.98
66.2252	0.064	0.050	0.056	0.004	85.88	89.18	87.76	88.47
99.3377	0.049	0.049	0.047	0.005	89.65	89.65	90.12	89.80
132.450	0.069	0.078	0.077	0.011	86.35	84.24	84.47	85.02
Kontrol	0.385	0.430	0.460					
IC ₅₀ (µg/mL)					33.46	37.85	39.15	36.82 ±2.98
<i>J. sibirica</i> /šišarke								
4.1391	0.419	0.415	0.416	0.011	1.92	2.88	2.64	2.48
8.2781	0.422	0.420	0.426	0.012	1.44	1.92	0.48	1.28
16.5563	0.416	0.412	0.419	0.009	2.16	3.13	1.44	2.24
33.1126	0.372	0.383	0.347	0.007	12.26	9.62	18.27	13.38
66.2252	0.254	0.268	0.235	0.006	40.38	37.02	44.95	40.79
99.3377	0.140	0.179	0.168	0.006	67.79	58.41	61.06	62.42
132.450	0.083	0.114	0.086	0.006	81.49	74.04	80.77	78.77
Kontrol	0.418	0.415	0.414					
IC ₅₀ (µg/mL)					76.50	84.44	77.40	79.45 ±4.35
<i>J. foetidissima</i> /iglice								
4.1391	0.385	0.413	0.040	0.005	2.81	-4.35	90.97	2.81
8.2781	0.374	0.398	0.392	0.004	5.37	-0.77	0.77	3.07
16.5563	0.321	0.393	0.335	0.004	18.93	0.51	15.35	11.59
33.1126	0.200	0.190	0.154	0.006	50.38	52.94	62.15	51.66
66.2252	0.075	0.094	0.082	0.003	81.59	76.73	79.80	79.37
99.3377	0.061	0.057	0.061	0.004	85.42	86.45	85.42	85.76
132.450	0.052	0.113	0.062	0.004	87.72	72.12	85.17	81.67
Kontrol	0.393	0.400	0.379					
IC ₅₀ (µg/mL)					33.13	39.44	34.74	35.77 ±3.28



Grafik 8.19. Zavisnost RSC_{O₂⁻} - radna koncentracija ekstrakata
J. sibirica/iglice;
J. sibirica/šišarke;
J. foetidissima/iglice

Tabela 8.22. Kapacitet „hvatanja“ O₂^{•-} radikala
(*J. foetidissima*/šišarke; *J. oxycedrus*/iglice; *J. oxycedrus*/šišarke - ekstrakt)

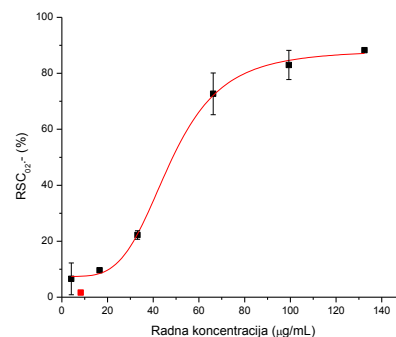
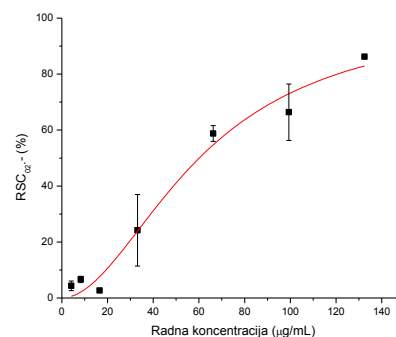
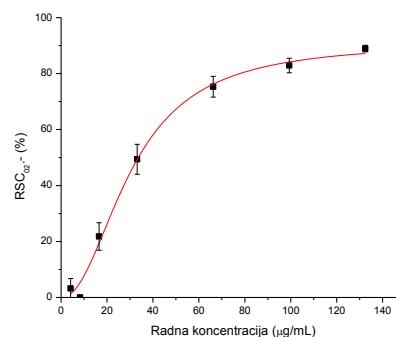
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC _{O₂^{•-}} (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. foetidissima</i> /šišarke								
4.1391	0.387	0.385	0.402	0.004	3.53	4.03	-0.25	3.78
8.2781	0.393	0.386	0.379	0.004	2.02	3.78	5.54	3.78
16.5563	0.376	0.338	0.284	0.005	6.55	16.12	29.72	17.46
33.1126	0.337	0.122	0.212	0.004	16.12	70.28	47.61	47.61
66.2252	0.074	0.070	0.073	0.003	82.12	83.12	82.37	82.54
99.3377	0.065	0.063	0.057	0.003	84.38	84.89	86.40	85.22
132.450	0.058	0.067	0.058	0.004	86.40	84.13	86.40	85.64
Kontrol	0.392	0.411	0.389					
IC ₅₀ (µg/mL)					33.84	28.00	31.44	31.09 ±2.94
<i>J. oxycedrus</i> /iglice								
4.1391	0.442	0.386	0.379	-0.003	-25.00	-9.27	-7.30	-13.86
8.2781	0.375	0.383	0.389	-0.003	-6.18	-8.43	-10.11	-8.24
16.5563	0.334	0.347	0.346	-0.002	5.62	1.97	2.25	3.28
33.1126	0.296	0.279	0.277	-0.003	16.01	20.79	21.35	19.38
66.2252	0.124	0.146	0.143	-0.001	64.89	58.71	59.55	61.05
99.3377	0.118	0.075	0.120	-0.001	66.57	78.65	66.01	70.41
132.450	0.082	0.082	0.099	0.005	78.37	78.37	73.60	76.78
Kontrol	0.356	0.372	0.367					
IC ₅₀ (µg/mL)					52.79	55.25	54.72	54.25 ±1.29
<i>J. oxycedrus</i> /šišarke								
4.1391	0.319	0.331	0.323	0.003	12.22	8.89	11.11	10.74
8.2781	0.333	0.342	0.334	0.002	8.06	5.56	7.78	7.13
16.5563	0.331	0.326	0.363	0.004	9.17	10.56	0.28	9.86
33.1126	0.350	0.346	0.349	0.004	3.89	5.00	4.17	4.35
66.2252	0.323	0.305	0.324	0.002	10.83	15.83	10.56	12.41
99.3377	0.263	0.249	0.298	0.002	27.50	31.39	17.78	25.56
132.450	0.160	0.175	0.169	0.002	56.11	51.94	53.61	53.89
Kontrol	0.347	0.350	0.382					
IC ₅₀ (µg/mL)					122.78	129.02	130.27	127.36 ±4.01



Grafik 8.20. Zavisnost RSC_{O₂^{•-}} - radna koncentracija ekstrakata
J. foetidissima/šišarke;
J. oxycedrus/iglice;
J. oxycedrus/šišarke

Tabela 8.23. Kapacitet „hvatanja“ O₂^{•-} radikala
(*J. sabina*/iglice; *J. sabina*/šišarke; *J. phoenicea*/iglice - ekstrakt)

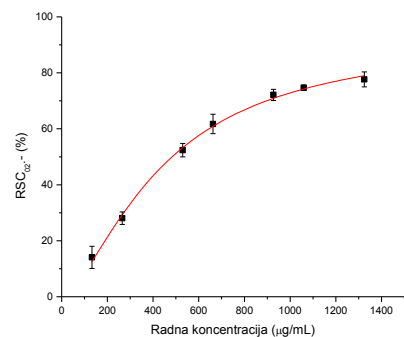
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC _{O₂^{•-}} (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. sabina</i> /iglice								
4.1391	0.345	0.367	0.36	0.002	7.30	1.35	1.08	3.24
8.2781	0.377	0.376	0.37	0.002	-1.35	-1.08	0.00	0.00
16.5563	0.275	0.311	0.28	0.002	26.22	16.49	22.70	21.80
33.1126	0.171	0.210	0.18	0.001	54.05	43.51	50.54	49.37
66.2252	0.111	0.094	0.08	0.005	71.35	75.95	78.65	75.32
99.3377	0.068	0.056	0.07	0.003	82.43	85.68	80.54	82.88
132.450	0.041	0.042	0.04	0.003	89.73	89.46	87.57	88.92
Kontrol	0.391	0.358	0.36					
IC ₅₀ (µg/mL)					32.29	37.14	31.85	33.76 ±2.94
<i>J. sabina</i> /šišarke								
4.1391	0.358	0.368	0.356	0.001	5.05	2.39	5.59	4.34
8.2781	0.348	0.354	0.364	0.000	7.45	5.85	3.19	6.65
16.5563	0.367	0.362	0.371	0.001	2.66	3.99	1.60	2.66
33.1126	0.252	0.356	0.320	0.001	33.24	5.59	15.16	24.20
66.2252	0.157	0.166	0.145	0.001	58.51	56.12	61.70	58.78
99.3377	0.118	0.095	0.169	0.001	68.88	75.00	55.32	66.40
132.450	0.052	0.055	0.054	0.002	86.70	85.90	86.17	86.26
Kontrol	0.369	0.367	0.392					
IC ₅₀ (µg/mL)					56.03	56.80	63.15	58.66 ±3.91
<i>J. phoenicea</i> /iglice								
4.1391	0.333	0.345	0.374	0.003	11.29	8.06	0.27	6.54
8.2781	0.367	0.379	0.368	0.002	1.88	-1.34	1.61	1.61
16.5563	0.336	0.340	0.339	0.002	10.22	9.14	9.41	9.59
33.1126	0.293	0.296	0.285	0.002	21.77	20.97	23.92	22.22
66.2252	0.080	0.135	0.102	0.004	79.57	64.78	73.66	72.67
99.3377	0.083	0.071	0.045	0.003	78.49	81.72	88.71	82.97
132.450	0.050	0.050	0.049	0.006	88.17	88.17	88.44	88.26
Kontrol	0.349	0.388	0.380					
IC ₅₀ (µg/mL)					44.27	52.85	46.59	47.90 ±4.44



Grafik 8.21. Zavisnost RSC_{O₂^{•-}} - radna koncentracija ekstrakata
J. sabina/iglice;
J. sabina/šišarke;
J. phoenicea/iglice

Tabela 8.24. Kapacitet „hvatanja“ O₂^{•-} radikala (*J. phoenicea*/šišarke - ekstrakt)

Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC _{O₂^{•-}} (%)			
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	Srednja vrednost
<i>J. phoenicea</i> /šišarke								
132.450	0.345	0.329	0.315	0.004	10.03	14.25	17.94	14.07
264.900	0.279	0.282	0.266	0.003	27.18	26.39	30.61	28.06
529.801	0.189	0.204	0.176	0.002	50.66	46.70	54.09	52.37
662.251	0.138	0.163	0.143	0.003	64.38	57.78	63.06	61.74
927.152	0.112	0.114	0.100	0.003	71.24	70.71	74.41	72.12
1059.60	0.100	0.102	0.095	0.003	74.41	73.88	75.73	74.67
1324.50	0.099	0.079	0.091	0.005	75.20	80.47	77.31	77.66
Kontrol	0.360	0.369	0.408					
IC ₅₀ (µg/mL)					479.61	533.53	452.35	488.50 ±41.31



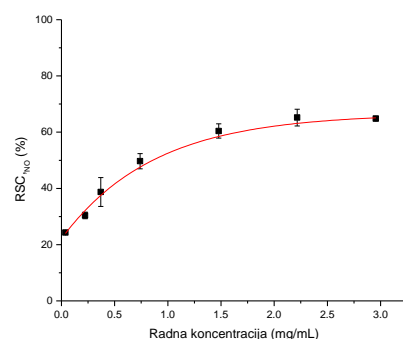
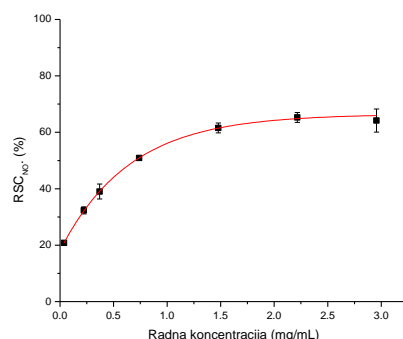
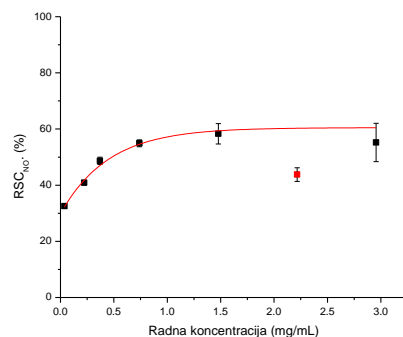
Grafik 8.22. Zavisnost RSC_{O₂^{•-}} - radna koncentracija ekstrakata *J. phoenicea*/šišarke

8.2.4. Kapacitet „hvatanja“ NO[•] radikala

Tabela 8.25. Kapacitet „hvatanja“ NO[•] radikala

(*J. communis*/iglice; *J. communis*/šišarke; *J. macrocarpa*/iglice – ekstrakt)

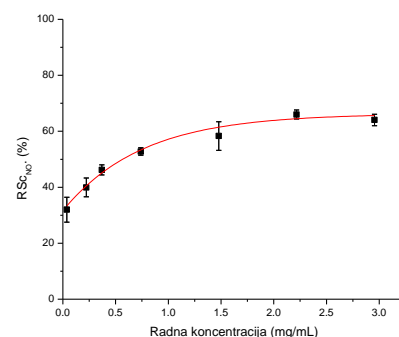
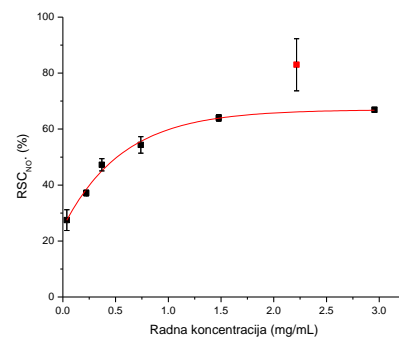
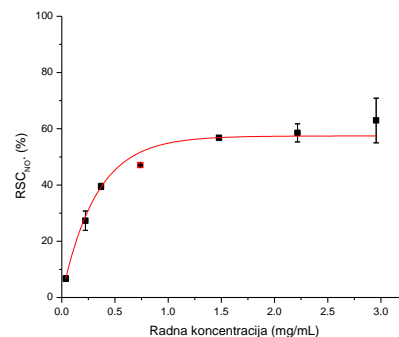
Radna konc. (mg/mL)	Apsorbancija				RSC _{NO[•]} (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. communis</i> /iglice								
0.037	0.197	0.196	0.200	0.053	32.87	33.22	31.62	32.57
0.222	0.194	0.185	0.182	0.056	36.12	40.33	41.42	39.29
0.369	0.176	0.170	0.173	0.063	47.34	49.96	48.74	48.68
0.739	0.173	0.168	0.172	0.074	53.99	56.34	54.46	54.93
1.478	0.220	0.206	0.219	0.125	55.94	62.50	56.50	58.32
2.217	0.257	0.259	0.267	0.140	45.53	44.82	41.00	43.79
2.956	0.273	0.294	0.309	0.187	60.06	50.37	43.46	51.30
Kontrola	0.266	0.262	0.274	0.053				
IC ₅₀ (mg/mL)					0.42	0.42	0.45	0.43 ±0.02
<i>J. communis</i> /šišarke								
0.037	0.204	0.204	0.204	0.051	21.00	20.69	20.76	20.82
0.222	0.181	0.184	0.186	0.053	33.67	32.24	31.17	32.36
0.369	0.178	0.173	0.168	0.055	36.29	39.22	41.56	39.02
0.739	0.154	0.152	0.152	0.058	50.22	51.34	51.13	50.90
1.478	0.137	0.137	0.131	0.060	60.48	60.62	63.59	61.56
2.217	0.138	0.131	0.132	0.066	63.25	66.45	66.12	65.28
2.956	0.145	0.138	0.129	0.068	60.28	63.83	68.43	64.18
Kontrola	0.249	0.244	0.247	0.053				
IC ₅₀ (mg/mL)					0.74	0.69	0.66	0.70 ±0.04
<i>J. macrocarpa</i> /iglice								
0.037	0.198	0.198	0.196	0.052	23.93	23.89	25.04	24.29
0.222	0.188	0.187	0.184	0.053	29.51	29.93	31.74	30.39
0.369	0.185	0.170	0.166	0.056	32.92	40.68	42.58	38.72
0.739	0.159	0.159	0.150	0.059	48.09	48.12	52.80	49.67
1.478	0.155	0.149	0.145	0.073	57.76	60.77	62.76	60.43
2.217	0.163	0.152	0.155	0.090	61.92	67.73	65.96	65.20
2.956	0.177	0.178	0.180	0.111	65.55	64.98	63.94	64.82
Kontrola	0.245	0.240	0.248	0.053				
IC ₅₀ (mg/mL)					0.90	0.78	0.63	0.84 ±0.08



Grafik 8.23. Zavisnost RSC_{NO[•]} – radna koncentracija ekstrakta
J. communis/iglice
J. communis/šišarke
J. macrocarpa/iglice

Tabela 8.26. Kapacitet „hvatanja“ NO[•] radikala
(*J. macrocarpa*/šišarke; *J. excelsa*/iglice; *J. excelsa*/šišarke - ekstrakt)

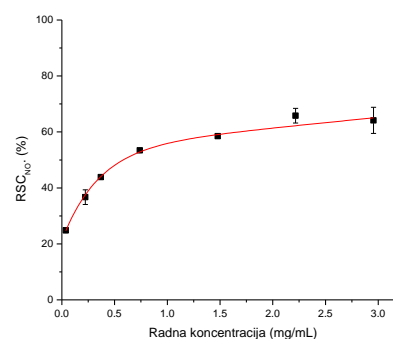
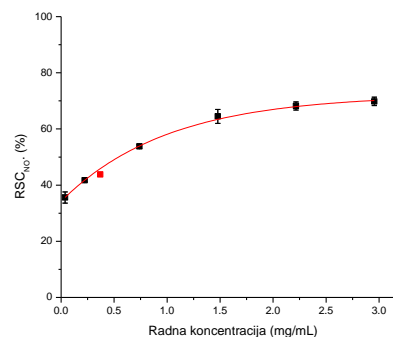
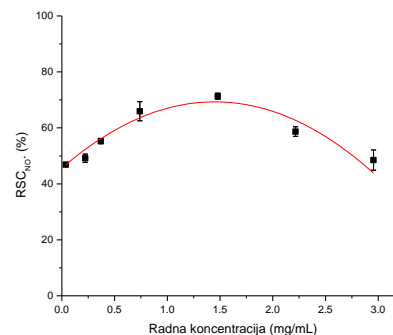
Radna konc. (mg/mL)	Apsorbancija				RSC _{NO[•]} (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. macrocarpa</i> /šišarke								
0.037	0.262	0.266	0.282	0.051	7.43	6.04	-1.32	6.73
0.222	0.229	0.213	0.222	0.056	24.05	30.93	26.95	27.31
0.369	0.196	0.200	0.201	0.061	40.69	39.12	38.62	39.48
0.739	0.193	0.194	0.198	0.073	47.22	46.92	44.99	47.07
1.478	0.206	0.207	0.205	0.108	56.69	56.34	57.36	56.80
2.217	0.226	0.240	0.238	0.140	62.26	56.29	57.15	58.57
2.956	0.229	0.252	0.264	0.164	71.63	61.26	56.00	62.96
Kontrola	0.270	0.272	0.295	0.051				
IC ₅₀ (mg/mL)					0.75	0.69	0.65	0.70 ±0.05
<i>J. excelsa</i> /iglice								
0.037	0.185	0.195	0.182	0.054	28.70	23.27	30.40	27.46
0.222	0.169	0.170	0.172	0.055	37.88	37.56	36.03	37.16
0.369	0.153	0.160	0.154	0.059	48.54	44.74	48.45	47.24
0.739	0.146	0.149	0.138	0.060	53.47	51.95	57.64	54.35
1.478	0.140	0.144	0.144	0.077	65.41	63.36	63.26	64.01
2.217	0.160	0.153	0.186	0.135	86.56	89.98	72.45	83.00
2.956	0.166	0.165	0.169	0.106	67.10	67.64	65.92	66.88
Kontrola	0.227	0.249	0.240	0.054				
IC ₅₀ (mg/mL)					0.5	0.57	0.47	0.51 ±0.05
<i>J. excelsa</i> /šišarke								
0.037	0.174	0.191	0.184	0.051	36.67	27.80	31.49	31.99
0.222	0.173	0.162	0.174	0.054	38.36	43.83	37.66	39.95
0.369	0.156	0.161	0.162	0.056	48.25	45.32	45.03	46.20
0.739	0.154	0.142	0.151	0.061	51.83	58.01	53.71	52.77
1.478	0.084	0.162	0.148	0.074	95.20	54.71	61.92	58.32
2.217	0.153	0.153	0.158	0.089	66.86	66.99	64.13	66.00
2.956	0.176	0.179	0.184	0.110	65.90	64.40	61.82	64.04
Kontrola	0.234	0.253	0.258	0.056				
IC ₅₀ (mg/mL)					0.58	0.52	0.56	0.55 ±0.03



Grafik 8.24. Zavisnost RSC_{NO[•]} – radna koncentracija ekstrakta
J. macrocarpa/šišarke;
J. excelsa/iglice;
J. excelsa/šišarke

Tabela 8.27. Kapacitet „hvatanja“ NO[•] radikala
(*J. sibirica*/iglice; *J. sibirica*/šišarke; *J. foetidissima*/iglice – ekstrakt)

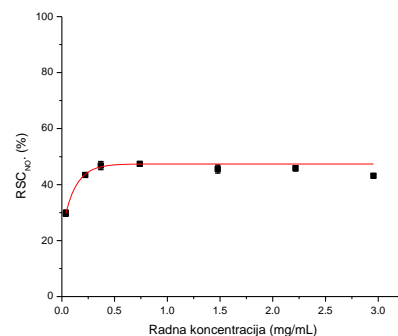
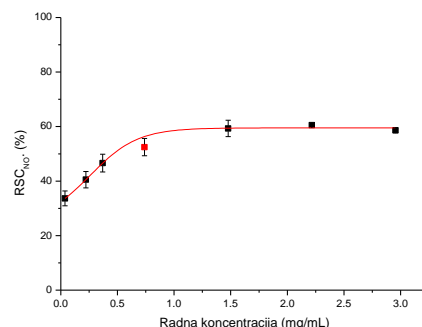
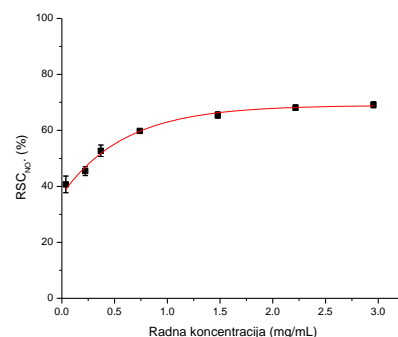
Radna konc. (mg/mL)	Apsorbancija				RSC _{NO[•]} (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. sibirica</i> /iglice								
0.037	0.182	0.183	0.183	0.056	47.00	46.75	46.78	46.84
0.222	0.177	0.182	0.189	0.058	50.18	48.06	44.99	49.12
0.369	0.171	0.173	0.168	0.064	55.13	54.46	56.29	55.29
0.739	0.162	0.151	0.214	0.075	63.52	68.36	42.12	65.94
1.478	0.198	0.193	0.195	0.126	70.10	72.31	71.48	71.30
2.217	0.262	0.268	0.259	0.164	59.00	56.80	60.24	58.68
2.956	0.686	0.334	0.346	0.217	-96.26	51.06	45.95	48.50
Kontrola	0.291	0.285	0.361	0.049				
IC ₅₀ (mg/mL)					0.17	0.16	0.13	0.15 ±0.02
<i>J. sibirica</i> /šišarke								
0.037	0.217	0.226	0.217	0.059	36.89	33.31	36.59	35.60
0.222	0.198	0.198	0.200	0.053	41.92	42.11	41.18	41.74
0.369	0.201	0.195	0.184	0.054	41.27	43.83	48.24	43.83
0.739	0.172	0.169	0.169	0.055	52.91	54.31	54.19	53.80
1.478	0.159	0.150	0.148	0.063	61.67	65.45	66.34	64.49
2.217	0.155	0.150	0.148	0.072	66.60	68.56	69.42	68.20
2.956	0.161	0.163	0.156	0.084	69.43	68.54	71.50	69.82
Kontrola	0.321	0.305	0.287	0.054				
IC ₅₀ (mg/mL)					0.58	0.53	0.51	0.54 ±0.04
<i>J. foetidissima</i> /iglice								
0.037	0.219	0.220	0.217	0.064	24.73	24.03	25.74	24.84
0.222	0.193	0.203	0.197	0.068	39.07	33.89	37.13	36.70
0.369	0.189	0.187	0.189	0.073	43.56	44.49	43.44	43.83
0.739	0.161	0.159	0.184	0.064	52.93	53.85	41.73	53.39
1.478	0.148	0.145	0.146	0.062	57.75	59.12	58.59	58.49
2.217	0.136	0.145	0.145	0.072	68.84	64.49	64.14	65.82
2.956	0.162	0.144	0.159	0.082	60.66	69.42	62.33	64.14
Kontrola	0.272	0.274	0.257	0.063				
IC ₅₀ (mg/mL)					0.61	0.59	0.64	0.61 ±0.03



Grafik 8.25. Zavisnost RSC_{NO[•]} – radna koncentracija ekstrakta
J. sibirica/iglice;
J. sibirica/šišarke;
J. foetidissima/iglice

Tabela 8.28. Kapacitet „hvatanja“ NO[•] radikala
(*J. foetidissima*/šišarke; *J. oxycedrus*/iglice; *J. oxycedrus*/šišarke - ekstrakt)

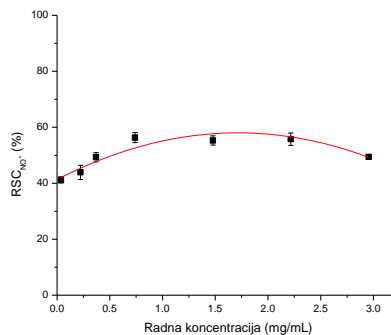
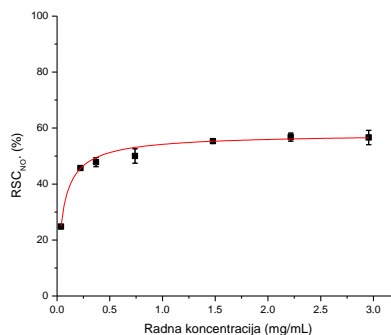
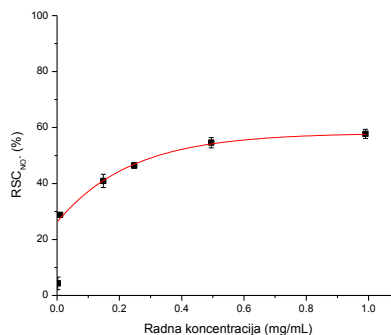
Radna konc. (mg/mL)	Apsorbancija				RSC _{NO[•]} (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. foetidissima</i> /šišarke								
0.037	0.179	0.192	0.190	0.058	44.12	38.54	39.47	40.71
0.222	0.165	0.173	0.177	0.056	50.14	46.57	44.34	45.46
0.369	0.158	0.165	0.153	0.058	54.17	51.27	56.74	52.72
0.739	0.146	0.147	0.145	0.059	59.87	59.34	60.26	59.83
1.478	0.138	0.138	0.134	0.061	64.71	65.01	66.79	65.50
2.217	0.139	0.141	0.137	0.069	68.04	67.17	69.12	68.11
2.956	0.143	0.147	0.147	0.078	70.36	68.35	68.77	69.16
Kontrola	0.261	0.280	0.282	0.057				
IC ₅₀ (mg/mL)					0.21	0.32	0.33	0.33 ±0.01
<i>J. oxycedrus</i> /iglice								
0.037	0.212	0.209	0.200	0.058	31.55	32.66	36.73	33.65
0.222	0.196	0.194	0.186	0.057	38.39	39.33	42.65	40.52
0.369	0.185	0.179	0.170	0.058	43.64	46.04	50.11	46.60
0.739	0.171	0.161	0.154	0.059	50.20	54.70	57.62	52.45
1.478	0.164	0.152	0.153	0.065	55.83	61.16	60.89	59.29
2.217	0.164	0.163	0.164	0.075	60.39	60.81	60.46	60.55
2.956	0.179	0.176	0.176	0.084	57.62	59.01	59.15	58.59
Kontrola	0.282	0.294	0.275	0.059				
IC ₅₀ (mg/mL)					0.70	0.49	0.40	0.45 ±0.06
<i>J. oxycedrus</i> /šišarke								
0.037	0.212	0.210	0.207	0.055	28.64	29.72	30.96	29.78
0.222	0.180	0.181	0.179	0.055	43.54	42.76	43.98	43.42
0.369	0.175	0.178	0.171	0.057	46.60	45.45	48.37	46.81
0.739	0.171	0.171	0.171	0.055	47.47	47.35	47.35	47.39
1.478	0.182	0.176	0.176	0.058	43.91	46.30	46.39	45.54
2.217	0.181	0.181	0.178	0.061	45.08	45.51	46.85	45.81
2.956	0.189	0.191	0.190	0.065	43.71	42.41	43.27	43.13
Kontrola	0.274	0.273	0.279	0.056				
IC ₅₀ (mg/mL)								> 2.956



Grafik 8.26. Zavisnost RSC_{NO[•]} – radna koncentracija ekstrakta
J. foetidissima/šišarke;
J. oxycedrus/iglice;
J. oxycedrus/šišarke

Tabela 8.29. Kapacitet „hvatanja“ NO[•] radikala
(*J. sabina*/iglice; *J. sabina*/šišarke; *J. phoenicea*/iglice - ekstrakt)

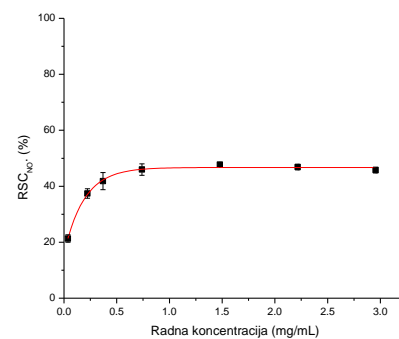
Radna konc. (mg/mL)	Apsorbancija				RSC _{NO} (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. sabina</i> /iglice								
0.002	0.275	0.304	0.26	0.056	2.73	-10.08	5.88	4.30
0.010	0.234	0.217	0.21	0.056	21.08	28.43	29.17	28.80
0.025	0.206	0.197	0.19	0.058	34.25	38.37	41.55	38.06
0.149	0.194	0.235	0.18	0.057	39.27	20.90	42.60	40.93
0.248	0.175	0.178	0.16	0.056	47.12	45.78	51.45	46.45
0.495	0.170	0.156	0.16	0.057	49.67	55.89	53.31	54.60
0.990	0.159	0.157	0.15	0.061	56.49	57.13	59.57	57.73
Kontrola	0.274	0.276	0.29	0.058				
IC ₅₀ (mg/mL)					0.36	0.33	0.25	0.35 ±0.02
<i>J. sabina</i> /šišarke								
0.037	0.216	0.181	0.052	0.037	24.57	25.06	41.18	24.81
0.222	0.176	0.144	0.057	0.222	45.41	46.02	60.30	45.72
0.369	0.170	0.165	0.055	0.369	46.46	47.37	49.66	47.83
0.739	0.168	0.153	0.055	0.739	51.85	48.21	55.24	50.03
1.478	0.154	0.154	0.057	1.478	54.49	55.73	55.77	55.33
2.217	0.160	0.153	0.061	2.217	57.06	55.23	58.06	56.78
2.956	0.162	0.155	0.066	2.956	54.33	56.15	59.38	56.62
Kontrola	0.248	0.260	0.314	0.055				
IC ₅₀ (mg/mL)					0.41	0.41	0.41	0.41 ±0.00
<i>J. phoenicea</i> /iglice								
0.037	0.197	0.198	0.193	0.053	40.73	40.39	42.47	41.194
0.222	0.202	0.187	0.196	0.055	39.81	45.69	42.10	43.89425
0.369	0.187	0.182	0.165	0.061	48.13	50.48	57.15	49.30761
0.739	0.179	0.170	0.163	0.060	51.21	55.01	57.58	56.29612
1.478	0.177	0.170	0.169	0.063	53.38	55.95	56.51	55.28039
2.217	0.184	0.176	0.195	0.072	54.18	57.30	49.71	55.7369
2.956	0.205	0.202	0.201	0.079	48.44	49.70	50.06	49.40026
Kontrola	0.301	0.302	0.292	0.054				
IC ₅₀ (mg/mL)					0.71	0.49	0.5	0.50 ±0.01



Grafik 8.27. Zavisnost RSC_{NO} – radna koncentracija ekstrakta
J. sabina/iglice;
J. sabina/šišarke;
J. phoenicea/iglice

Tabela 8.30. Kapacitet „hvatanja“ NO[•] radikala
(*J. phoenicea*/šišarke - ekstrakt)

Radna konc. (mg/mL)	Apsorbancija				RSC _{NO[•]} (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. phoenicea</i> /šišarke								
0.037	0.241	0.246	0.240	0.056	21.86	19.78	22.29	21.31
0.222	0.218	0.209	0.203	0.057	32.28	36.23	38.60	37.42
0.369	0.203	0.189	0.193	0.057	38.46	44.41	42.58	41.82
0.739	0.193	0.186	0.184	0.060	43.62	46.89	47.38	45.96
1.478	0.183	0.176	0.182	0.058	47.47	50.54	47.98	47.72
2.217	0.187	0.184	0.176	0.059	46.16	47.54	50.51	46.85
2.956	0.190	0.189	0.185	0.059	45.00	45.40	46.92	45.77
Kontrola	0.304	0.298	0.290	0.061				
IC ₅₀ (mg/mL)					> 2.956			



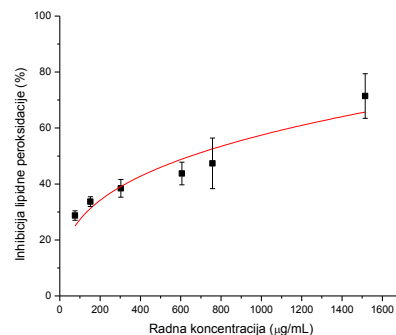
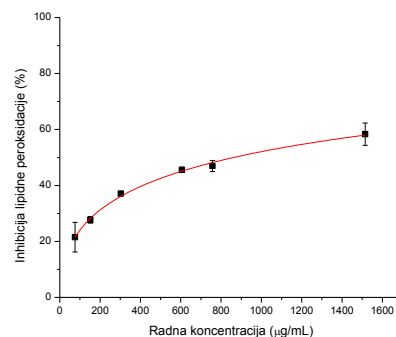
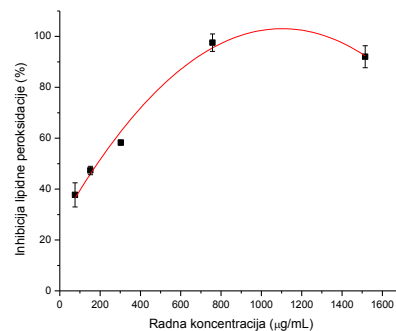
Grafik 8.28. Zavisnost RSC_{NO[•]} – radna koncentracija ekstrakta *J. phoenicea*/šišarke

8.2.5. Inhibicija lipidne peroksidacije

Tabela 8.31. Inhibicija lipidne peroksidacije

(*J. communis*/iglice; *J. communis*/šišarke; *J. macrocarpa*/iglice - ekstrakt)

Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				Inhibicija lipidne peroksidacije (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. communis</i> /iglice								
75.76	0.169	0.156	0.172	0.054	35.89	43.10	34.18	37.72
151.52	0.152	0.146	0.148	0.054	45.53	48.73	47.68	47.31
303.03	0.139	0.140	0.142	0.066	59.19	58.30	57.27	58.26
606.06	0.148	0.149	0.138	0.074	58.77	57.99	64.55	60.44
757.58	0.134	0.145	0.134	0.133	99.46	93.63	99.60	97.56
1515.15	0.134	0.147	0.146	0.128	97.01	89.26	89.81	92.02
Kontrola	0.152	0.146	0.148	0.054	45.53	48.73	47.68	
IC ₅₀ (µg/mL)					193.98	164.91	195.77	184.89 ±17.32
<i>J. communis</i> /šišarke								
75.76	0.164	0.181	0.167	0.041	25.30	15.48	23.81	21.53
151.52	0.162	0.162	0.159	0.041	27.10	26.87	28.53	27.70
303.03	0.148	0.148	0.148	0.044	37.12	37.01	37.06	37.09
606.06	0.142	0.144	0.145	0.054	46.64	45.24	44.82	45.57
757.58	0.143	0.145	0.140	0.055	46.37	45.54	48.35	46.95
1515.15	0.164	0.151	0.155	0.088	54.00	61.83	59.13	58.32
Kontrola	0.164	0.181	0.167	0.041				
IC ₅₀ (µg/mL)					960.42	846.49	854.7	887.20 ±63.54
<i>J. macrocarpa</i> /iglice								
75.76	0.171	0.166	0.165	0.041	26.84	29.29	30.05	28.72
151.52	0.160	0.166	0.161	0.044	35.10	31.72	34.29	33.71
303.03	0.171	0.168	0.160	0.057	36.01	37.35	42.05	38.47
606.06	0.176	0.190	0.182	0.083	47.48	39.46	44.28	43.74
757.58	0.181	0.195	0.163	0.086	46.29	38.92	56.91	47.37
1515.15	0.193	0.168	0.169	0.126	62.21	76.41	75.67	71.43
Kontrola	0.171	0.166	0.165	0.041				
IC ₅₀ (µg/mL)					775.18	713.87	517.56	744.53 ±43.35

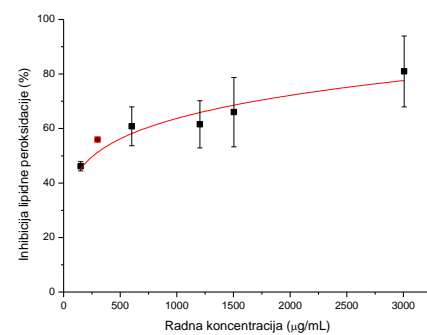
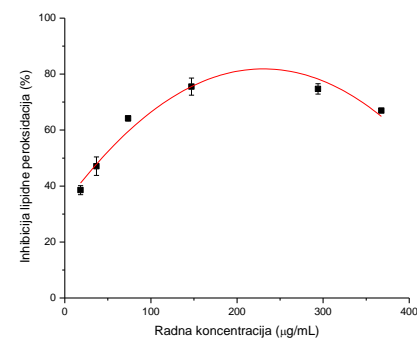
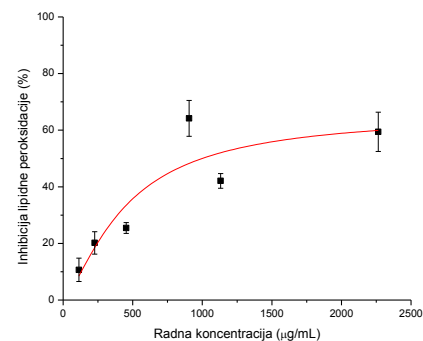


Grafik 8.29. Zavisnost I_{LP} – radna koncentracija ekstrakta

J. communis/iglice;
J. communis/šišarke;
J. macrocarpa/iglice

Tabela 8.32. Inhibicija lipidne peroksidacije
(*J. macrocarpa*/šišarke; *J. excelsa*/iglice; *J. excelsa*/šišarke - ekstrakt)

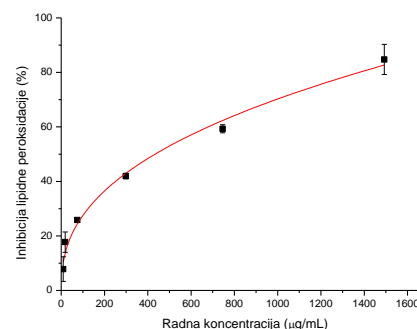
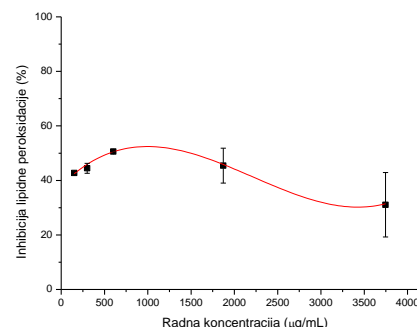
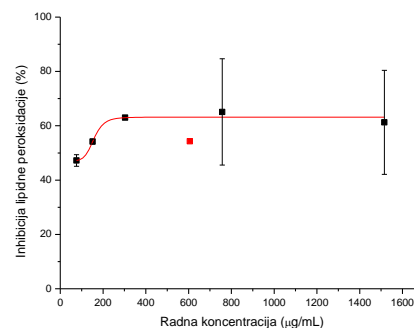
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				Inhibicija lipidne peroksidacije (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. macrocarpa</i> /šišarke								
113.21	0.306	0.332	0.324	0.039	15.24	7.20	9.55	10.66
226.42	0.296	0.304	0.280	0.041	19.38	16.71	24.45	20.18
452.83	0.272	0.278	0.284	0.042	27.43	25.39	23.59	25.47
905.66	0.265	0.237	0.227	0.130	57.07	66.15	69.27	64.16
1132.08	0.242	0.258	0.254	0.068	44.99	40.08	41.18	42.08
2264.15	0.238	0.272	0.231	0.119	62.22	51.49	64.49	59.40
Kontrola	0.306	0.332	0.324	0.039				
IC ₅₀ (µg/mL)					1081.58	1083.52	909.45	1024.85 ±99.94
<i>J. excelsa</i> /iglice								
18.38	0.181	0.178	0.176	0.078	36.77	38.90	39.92	38.53
36.76	0.165	0.164	0.155	0.075	45.01	45.38	50.89	47.10
73.53	0.136	0.134	0.133	0.076	63.22	64.40	64.92	64.18
147.06	0.196	0.136	0.129	0.092	36.56	73.37	77.69	75.53
294.12	0.137	0.194	0.141	0.098	76.02	40.63	73.39	74.71
367.65	0.235	0.182	0.162	0.128	34.54	66.98	79.16	66.98
Kontrola	0.324	0.270	0.223	0.084				
IC ₅₀ (µg/mL)					36.77	38.90	39.92	40.41 ±4.12
<i>J. excelsa</i> /šišarke								
150.38	0.199	0.202	0.209	0.044	47.52	46.68	44.30	46.17
300.75	0.179	0.178	0.179	0.048	55.77	56.19	55.86	55.94
601.50	0.195	0.196	0.165	0.064	55.77	55.29	65.86	60.81
1203.01	0.214	0.217	0.171	0.087	57.04	56.06	71.53	61.55
1503.76	0.231	0.178	0.252	0.104	57.00	75.01	49.97	66.01
3007.52	0.240	0.213	0.289	0.191	83.47	92.50	66.88	80.95
Kontrola	0.295	0.425	0.278	0.037				
IC ₅₀ (µg/mL)					259.37	258.74	229.37	249.16 ±17.14



Grafik 8.30. Zavisnost I_{LP} – radna koncentracija ekstrakta
J. macrocarpa/šišarke;
J. excelsa/iglice;
J. excelsa/šišarke

Tabela 8.33. Inhibicija lipidne peroksidacije
(*J. sibirica*/iglice; *J. sibirica*/šišarke; *J. foetidissima*/iglice – ekstrakt)

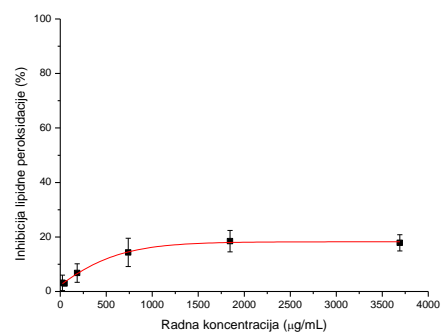
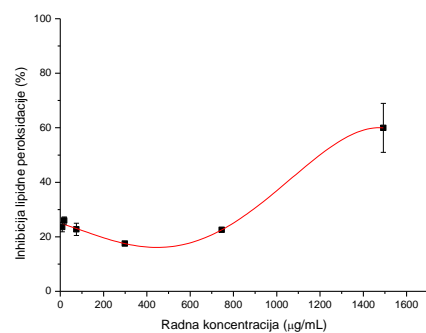
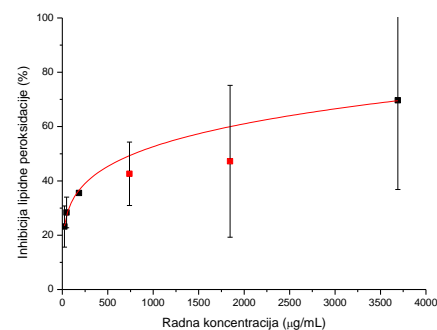
Radna konc. (µg/mL).	Apsorbancija				Inhibicija lipidne peroksidacije (%)			
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	Srednja vrednost
<i>J. sibirica</i> /iglice								
75.76	0.117	0.113	0.111	0.045	44.80	47.98	48.86	47.21
151.52	0.110	0.108	0.104	0.049	53.54	54.80	57.93	54.17
303.03	0.127	0.140	0.105	0.057	45.58	35.97	62.97	62.97
606.06	0.140	0.148	0.138	0.081	54.29	48.79	56.17	54.29
757.58	0.164	0.153	0.116	0.099	49.65	58.53	87.11	65.10
1515.15	0.124	0.198	0.163	0.130	104.33	47.74	74.79	61.27
Kontrola	0.139	0.184	0.182	0.038				
IC ₅₀ (µg/mL)					131.00	1431.03	103.84	117.42 ±19.21
<i>J. sibirica</i> /šišarke								
150.38	0.232	0.236	0.234	0.056	43.33	42.14	42.70	42.72
300.75	0.215	0.226	0.224	0.049	46.52	43.22	43.59	44.44
601.50	0.212	0.214	0.213	0.059	50.77	50.39	50.62	50.59
1498.13	0.303	0.310	0.333	0.097	33.78	31.56	24.18	29.84
1872.66	0.310	0.273	0.279	0.118	38.15	50.16	47.97	45.43
3745.32	0.434	0.361	0.397	0.183	19.24	42.83	31.16	31.07
Kontrola	0.369	0.340	0.336	0.037				
IC ₅₀ (µg/mL)					487.40	595.59	577.75	553.58 ±58.00
<i>J. foetidissima</i> /iglice								
9.33	0.207	0.197	0.220	0.050	4.62	11.04	-3.28	7.83
18.66	0.198	0.186	0.189	0.055	13.57	20.82	18.79	17.73
74.63	0.179	0.177	0.177	0.055	25.14	26.18	26.14	25.82
298.51	0.161	0.163	0.179	0.066	42.65	41.29	31.23	41.97
746.27	0.148	0.164	0.167	0.099	69.95	60.38	58.25	59.32
1492.54	0.147	0.248	0.160	0.129	88.67	27.86	80.84	84.75
Kontrola	0.233	0.206	0.203	0.049				
IC ₅₀ (µg/mL)					397.66	454.63	422.68	424.99 ±28.56



Grafik 8.31. Zavisnost I_{LP} – radna koncentracija ekstrakta
J. sibirica/iglice;
J. sibirica/šišarke;
J. foetidissima/iglice

Tabela 8.34. Inhibicija lipidne peroksidacije
(*J. foetidissima*/šišarke; *J. oxycedrus*/iglice; *J. oxycedrus*/šišarke - ekstrakt)

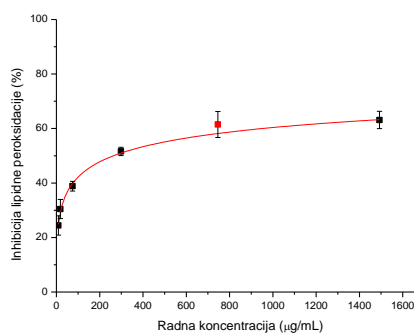
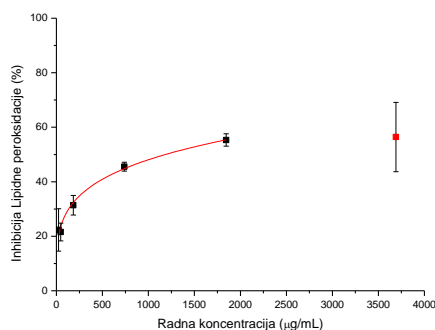
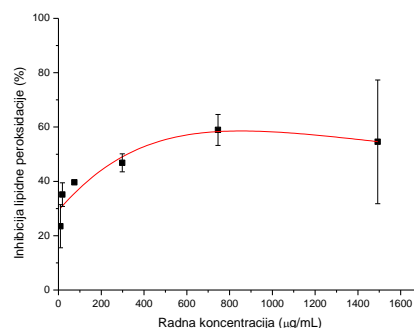
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				Inhibicija lipidne peroksidacije (%)			
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	Srednja vrednost
<i>J. foetidissima</i> /šišarke								
23.06	0.187	0.175	0.162	0.049	15.74	22.90	30.89	23.17
46.13	0.167	0.179	0.161	0.051	29.41	22.26	33.40	28.36
184.50	0.257	0.203	0.165	0.059	-20.43	12.31	35.53	35.53
738.01	0.174	0.206	0.172	0.090	48.75	29.15	49.96	42.62
1845.02	0.196	0.261	0.242	0.142	67.02	27.46	39.04	47.24
3690.04	0.310	0.211	0.222	0.198	31.95	91.85	85.31	69.70
Kontrola	0.208	0.203	0.224	0.048				
IC ₅₀ (µg/mL)					771.04	2972.85	741.51	756.28 ±20.88
<i>J. oxycedrus</i> /iglice								
9.33	0.139	0.135	0.136	0.046	21.65	24.98	24.14	23.59
18.66	0.138	0.183	0.136	0.049	25.04	-12.31	26.91	25.98
74.63	0.143	0.139	0.144	0.050	22.27	25.21	20.78	22.75
298.51	0.176	0.194	0.164	0.066	7.31	-7.75	17.53	17.53
746.27	0.194	0.215	0.221	0.102	22.57	4.39	-0.75	22.57
1492.54	0.178	0.166	0.187	0.129	58.99	69.38	51.51	59.96
Kontrola	0.165	0.171	0.159	0.046				
IC ₅₀ (µg/mL)					1191.42	808.25	1204.72	1198.07 ±9.40
<i>J. oxycedrus</i> /šišarke								
23.06	0.195	0.210	0.204	0.048	10.20	1.16	5.20	3.18
46.13	0.205	0.213	0.191	0.046	2.93	-1.67	11.48	2.93
184.50	0.196	0.207	0.201	0.049	9.83	3.13	7.34	6.77
738.01	0.201	0.189	0.245	0.055	10.67	18.02	-16.02	14.35
1845.02	0.211	0.198	0.202	0.070	14.08	21.67	19.62	18.45
3690.04	0.221	0.231	0.223	0.091	20.14	14.49	18.96	17.86
Kontrola	0.208	0.203	0.224	0.048				
IC ₅₀ (µg/mL)					>3690.04			



Grafik 8.32. Zavisnost I_{LP} – radna koncentracija ekstrakta
J. foetidissima/šišarke;
J. oxycedrus/iglice;
J. oxycedrus/šišarke

Tabela 8.35. Inhibicija lipidne peroksidacije
(*J. sabina*/iglice; *J. sabina*/šišarke; *J. phoenicea*/iglice - ekstrakt)

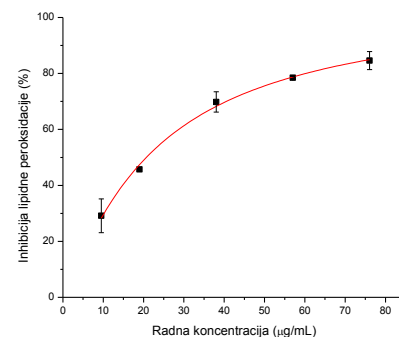
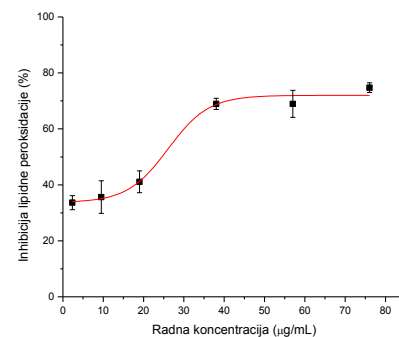
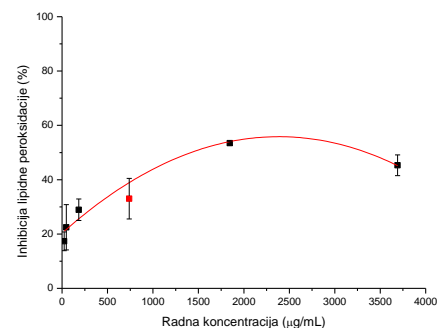
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				Inhibicija lipidne peroksidacije (%)			
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	Srednja vrednost
<i>J. sabina</i> /iglice								
9.33	0.251	0.223	0.24	0.041	17.86	29.11	20.02	23.49
18.66	0.206	0.221	0.22	0.052	39.91	33.97	31.48	35.12
74.63	0.201	0.306	0.30	0.047	39.66	-1.24	-0.39	39.66
298.51	0.200	0.183	0.19	0.055	43.37	49.98	47.20	46.85
746.27	0.167	0.179	0.19	0.076	64.14	59.81	52.86	58.93
1492.54	0.263	0.172	0.28	0.122	45.17	80.53	37.97	54.56
Kontrola	0.286	0.255	0.35	0.042				
IC ₅₀ (µg/mL)					334.55	345.87	459.30	340.21 ±8.0
<i>J. sabina</i> /šišarke								
23.06	0.205	0.177	0.184	0.043	13.55	28.42	25.00	22.32
46.13	0.193	0.198	0.186	0.045	21.03	18.56	25.03	21.54
184.50	0.183	0.161	0.174	0.050	28.84	40.86	33.93	31.38
738.01	0.155	0.159	0.161	0.056	47.33	45.24	44.09	45.55
1845.02	0.151	0.145	0.171	0.064	53.72	56.93	42.92	55.32
3690.04	0.195	0.149	0.160	0.086	42.19	66.66	60.36	56.40
Kontrola	0.223	0.209	0.250	0.039				
IC ₅₀ (µg/mL)					1155.6	1049.3	1383.9	1102.45 ±75.12
<i>J. phoenicea</i> /iglice								
9.33	0.246	0.237	0.228	0.044	20.91	24.30	27.99	24.40
18.66	0.236	0.223	0.219	0.048	26.52	31.51	33.28	30.44
74.63	0.206	0.198	0.206	0.047	37.74	40.87	37.88	38.83
298.51	0.189	0.181	0.183	0.060	49.92	52.87	52.02	51.60
746.27	0.186	0.167	0.189	0.082	59.26	66.99	58.24	61.49
1492.54	0.213	0.226	0.211	0.122	64.56	59.47	65.32	63.12
Kontrola	0.286	0.255	0.353	0.042				
IC ₅₀ (µg/mL)					284.84	279.18	284.14	282.72 ±3.09



Grafik 8.33. Zavisnost I_{LP} – radna koncentracija ekstrakta
J. sabina/iglice;
J. sabina/šišarke;
J. phoenicea/iglice

Tabela 8.36. Inhibicija lipidne peroksidacije (*J. phoenicea*/šišarke; BHA; BHT – ekstrakt i standardi)

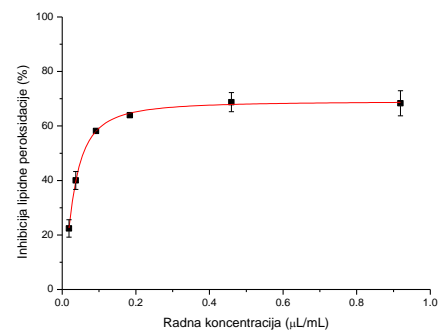
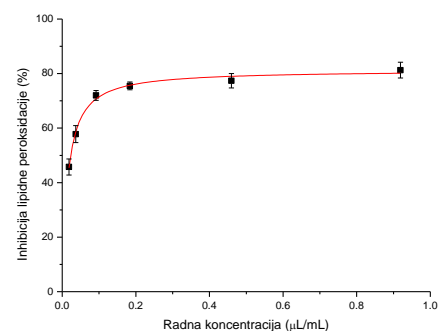
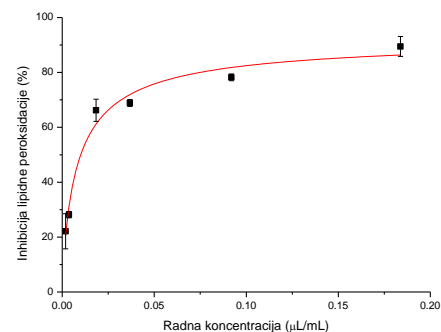
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				Inhibicija lipidne peroksidacije (%)			
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	Srednja vrednost
<i>J. phoenicea</i> /šišarke								
23.06	0.208	0.199	0.195	0.045	13.49	18.34	20.15	17.33
46.13	0.177	0.199	0.207	0.048	31.81	19.91	15.73	22.48
184.50	0.208	0.172	0.198	0.069	26.13	45.38	31.75	28.94
738.01	0.201	0.193	0.174	0.058	23.97	27.72	38.29	33.01
1845.02	0.207	0.205	0.207	0.119	53.00	54.21	53.12	53.44
3690.04	0.223	0.232	0.237	0.128	49.45	44.56	41.96	45.32
Kontrola	0.223	0.209	0.250	0.039				
IC ₅₀ (µg/mL)					1502.9	1841.8	1420.8	1461.88 ±58.03
BHA								
2.36	0.194	0.195	0.185	0.046	32.42	31.96	36.53	33.64
9.51	0.157	0.196	0.178	0.046	49.32	31.51	39.73	35.62
19.01	0.176	0.183	0.166	0.046	40.64	37.44	45.21	41.10
38.02	0.112	0.119	0.111	0.046	69.86	66.67	70.32	68.95
57.03	0.102	0.118	0.122	0.046	74.43	67.12	65.30	68.95
76.05	0.104	0.098	0.105	0.047	73.97	76.71	73.52	74.73
Kontrola	0.273	0.252	0.253	0.040				
IC ₅₀ (µg/mL)					24.73	26.27	21.35	24.12 ±2.52
BHT								
2.36	0.147	0.173	0.150	0.047	55.16	43.50	53.81	50.82
9.51	0.193	0.219	0.200	0.046	34.08	22.42	30.94	29.15
19.01	0.253	0.175	0.250	0.054	10.76	45.74	12.11	45.74
38.02	0.121	0.121	0.107	0.049	67.71	67.71	73.99	69.81
57.03	0.100	0.102	0.101	0.053	78.92	78.03	78.48	78.48
76.05	0.096	0.097	0.084	0.058	82.96	82.51	88.34	84.60
Kontrola	0.268	0.238	0.284	0.040				
IC ₅₀ (µg/mL)					18.47	21.69	17.81	19.32 ±2.08



Grafik 8.34. Zavisnost I_{LP} – radna koncentracija ekstrakta/standarda *J. phoenicea*/šišarke; BHA; BHT

Tabela 8.37. Inhibicija lipidne peroksidacije
(*J. communis*/iglice; *J. communis*/šišarke; *J. macrocarpa*/iglice – etarsko ulje)

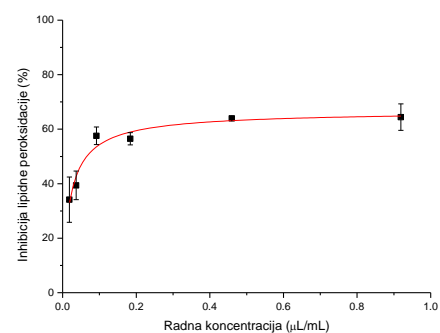
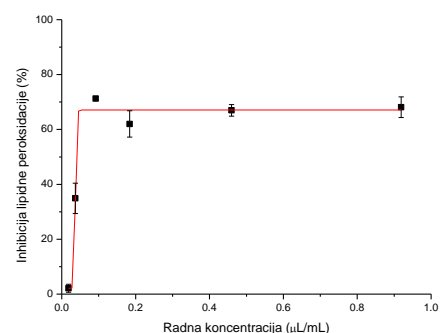
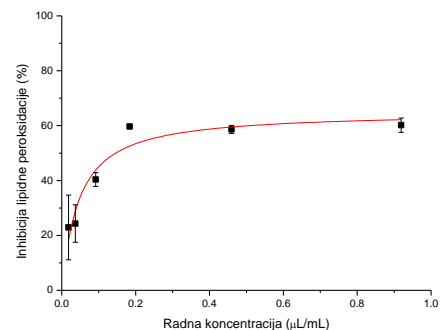
Radna konc. (μL/mL)	Apsorbancija				Inhibicija lipidne peroksidacije (%)			
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	Srednja vrednost
<i>J. communis</i> /iglice								
0.00184	0.201	0.196	0.215	0.086	23.94	27.39	15.01	22.11
0.00368	0.197	0.195	0.194	0.086	26.95	28.28	29.25	28.16
0.01838	0.137	0.148	0.137	0.089	68.48	61.55	68.62	66.21
0.03676	0.124	0.127	0.128	0.079	70.32	68.30	67.98	68.87
0.09191	0.109	0.111	0.113	0.078	79.47	78.24	76.99	78.23
0.18382	0.098	0.108	0.099	0.086	91.88	85.31	91.19	89.46
Kontrola	0.236	0.231	0.231	0.080				
IC ₅₀ (nL/mL)					9.54	10.61	9.79	9.98 ±0.56
<i>J. communis</i> /šišarke								
0.01838	0.178	0.190	0.193	0.045	49.09	44.63	43.48	45.73
0.03676	0.163	0.159	0.147	0.046	55.33	56.74	61.30	57.79
0.09191	0.128	0.121	0.119	0.050	69.97	72.53	73.42	71.97
0.18382	0.121	0.113	0.118	0.053	74.26	77.04	75.13	75.48
0.45956	0.112	0.126	0.116	0.059	79.56	74.46	78.17	77.39
0.91912	0.106	0.115	0.100	0.058	81.66	78.17	83.94	81.26
Kontrola	0.307	0.279	0.343	0.049				
IC ₅₀ (nL/mL)					21.14	23.95	23.27	22.79 ±1.47
<i>J. macrocarpa</i> /iglice								
0.01838	0.247	0.232	0.236	0.045	18.85	25.07	23.33	22.41
0.03676	0.199	0.188	0.148	0.044	37.71	42.34	58.44	40.02
0.09191	0.173	0.149	0.150	0.046	48.94	58.44	57.95	58.19
0.18382	0.135	0.138	0.135	0.046	64.33	63.12	64.48	63.98
0.45956	0.133	0.115	0.126	0.047	65.56	72.51	68.19	68.75
0.91912	0.141	0.118	0.127	0.050	63.45	72.55	68.98	68.33
Kontrola	0.334	0.255	0.283	0.042				
IC ₅₀ (nL/mL)					57.61	56.70	57.66	57.32 ±0.54



Grafik 8.34. Zavisnost I_{LP} – radna koncentracija etarskog ulja
J. communis/iglice;
J. communis/šišarke;
J. macrocarpa/iglice

Tabela 8.38. Inhibicija lipidne peroksidacije
(*J. macrocarpa*/šišarke; *J. excelsa*/iglice; *J. excelsa*/šišarke – etarsko ulje)

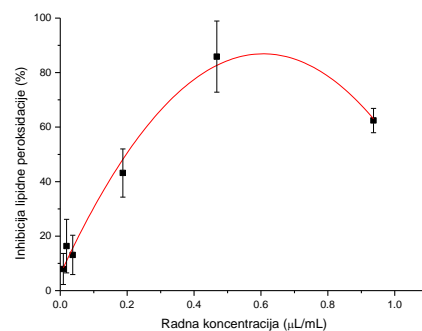
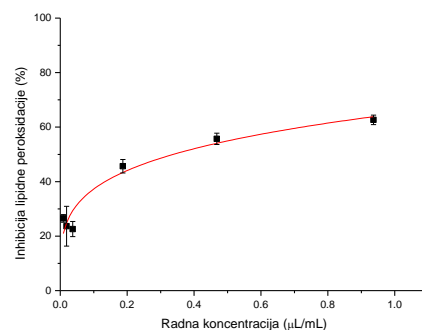
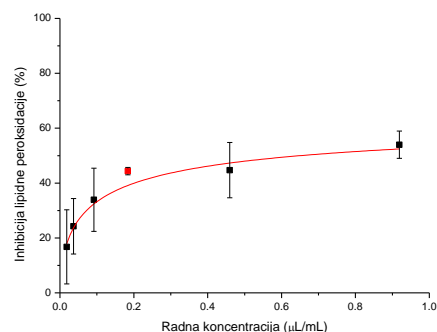
Radna konc. (μL/mL)	Apsorbancija				Inhibicija lipidne peroksidacije (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. macrocarpa</i> /šišarke								
0.01838	0.196	0.181	0.229	0.040	25.78	33.03	9.97	22.92
0.03676	0.188	0.215	0.193	0.039	29.49	16.60	26.89	24.33
0.09191	0.171	0.160	0.166	0.041	37.89	42.95	40.29	40.38
0.18382	0.125	0.127	0.131	0.042	60.19	59.23	57.56	59.71
0.45956	0.133	0.136	0.130	0.046	58.88	57.04	59.95	58.62
0.91912	0.125	0.136	0.130	0.047	62.70	57.50	60.31	60.17
Kontrola	0.215	0.260	0.273	0.039				
IC ₅₀ (nL/mL)					151.14	174.72	152.47	159.44 ±13.25
<i>J. excelsa</i> /iglice								
0.01838	0.251	0.253	0.247	0.046	1.60	0.99	3.78	2.12
0.03676	0.169	0.193	0.180	0.045	40.28	29.21	35.24	34.91
0.09191	0.105	0.218	0.159	0.045	71.28	16.97	45.04	71.28
0.18382	0.132	0.121	0.140	0.052	61.37	67.10	57.55	62.01
0.45956	0.118	0.123	0.115	0.050	67.22	64.75	68.95	66.98
0.91912	0.127	0.117	0.111	0.052	64.11	68.65	71.57	68.11
Kontrola	0.251	0.245	0.267	0.045				
IC ₅₀ (nL/mL)					38.01	46.53	47.14	43.89 ±5.10
<i>J. excelsa</i> /šišarke								
0.0184	0.187	0.209	0.174	0.052	35.59	25.18	41.60	34.13
0.0368	0.175	0.178	0.162	0.043	36.89	35.66	43.10	39.38
0.0919	0.155	0.149	0.141	0.060	54.41	57.42	60.85	57.56
0.1838	0.142	0.132	0.139	0.044	53.13	58.09	54.90	56.49
0.4596	0.121	0.122	0.120	0.046	63.83	63.57	64.45	63.95
0.9191	0.108	0.128	0.116	0.043	68.93	59.29	65.03	64.42
Kontrola	0.251	0.245	0.267	0.045	0.063	0.066	0.050	
IC ₅₀ (nL/mL)					62.81	66.60	50.04	59.82 ±9.0



Grafik 8.36. Zavisnost I_{LP} – radna koncentracija etarskog ulja
J. macrocarpa/šišarke;
J. excelsa/iglice;
J. excelsa/šišarke

Tabela 8.39. Inhibicija lipidne peroksidacije
(*J. sibirica*/iglice; *J. foetidissima*/iglice; *J. foetidissima*/šišarke – etarsko ulje)

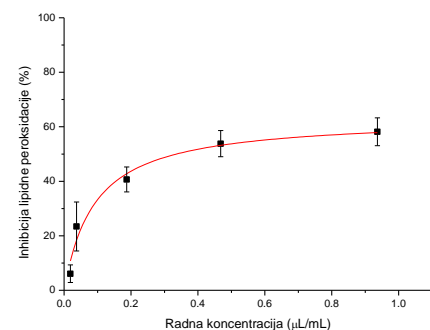
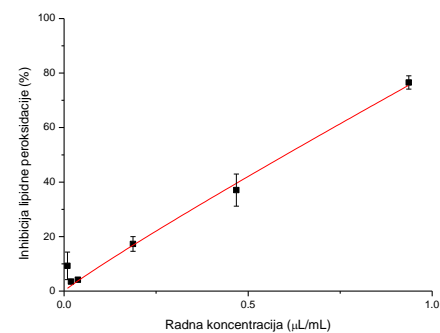
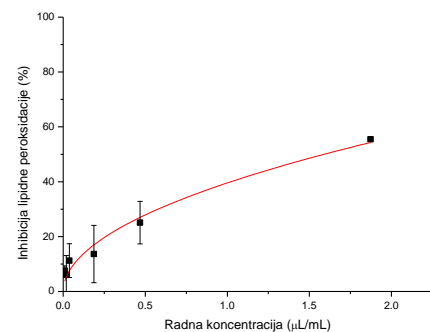
Radna konc. (μL/mL).	Apsorbancija				Inhibicija lipidne peroksidacije (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. sibirica</i> /iglice								
0.01838	0.177	0.226	0.216	0.045	32.09	6.52	11.65	16.76
0.03676	0.187	0.170	0.215	0.054	31.39	40.38	17.13	24.26
0.09191	0.162	0.194	0.141	0.050	42.05	25.76	53.03	33.91
0.18382	0.156	0.160	0.173	0.050	45.32	43.40	36.86	44.36
0.45956	0.166	0.135	0.172	0.050	40.69	56.20	37.26	44.72
0.91912	0.145	0.155	0.136	0.056	54.11	48.95	58.86	53.98
Kontrola	0.243	0.227	0.253	0.047				
IC ₅₀ (nL/mL)					744.04	351.81	698.38	721.21 ±32.29
<i>J. foetidissima</i> /iglice								
0.00936	0.252	0.260	0.254	0.051	27.65	24.94	26.94	26.51
0.01873	0.278	0.282	0.245	0.056	20.25	18.67	32.00	23.64
0.03745	0.268	0.255	0.254	0.044	19.40	24.13	24.25	22.59
0.18727	0.190	0.194	0.203	0.045	47.82	46.16	42.94	45.64
0.46816	0.164	0.172	0.154	0.045	57.17	54.22	60.57	55.69
0.93633	0.154	0.145	0.146	0.045	60.69	63.79	63.51	62.66
Kontrola	0.315	0.332	0.312	0.042				
IC ₅₀ (nL/mL)					201.41	338.33	332.82	335.58 ±3.90
<i>J. foetidissima</i> /šišarke								
0.00936	0.317	0.286	0.294	0.043	1.53	12.44	9.80	7.92
0.01873	0.323	0.258	0.296	0.044	-0.02	23.27	9.39	16.33
0.03745	0.299	0.303	0.270	0.043	8.01	6.46	18.20	13.10
0.18727	0.226	0.331	0.192	0.051	36.91	-0.76	49.42	43.16
0.46816	0.189	0.245	0.177	0.164	91.15	70.98	95.47	85.87
0.93633	0.187	0.163	0.181	0.073	58.90	67.45	60.95	62.43
Kontrola	0.315	0.332	0.312	0.042				
IC ₅₀ (nL/mL)					208.13	228.53	167.70	218.33 ±4.42



Grafik 8.37. Zavisnost I_{LP} – radna koncentracija etarskog ulja
J. sibirica/iglice;
J. foetidissima/iglice;
J. foetidissima/šišarke

Tabela 8.40. Inhibicija lipidne peroksidacije
(*J. oxycedrus*/iglice; *J. oxycedrus*/šišarke; *J. sabina*/iglice – etarsko ulje)

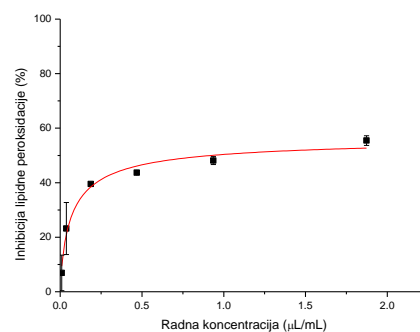
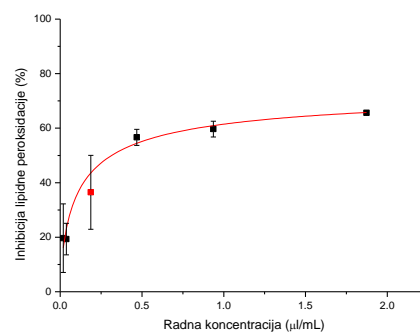
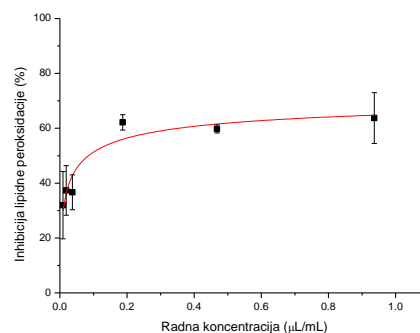
Radna konc. (μL/mL)	Apsorbancija				Inhibicija lipidne peroksidacije (%)			Srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	
<i>J. oxycedrus</i> /iglice								
0.00936	0.202	0.202	0.207	0.057	8.67	8.50	5.50	7.56
0.01873	0.204	0.184	0.203	0.049	1.32	14.15	2.51	5.99
0.03745	0.211	0.192	0.197	0.060	4.36	16.21	13.19	11.25
0.18727	0.204	0.192	0.171	0.053	4.21	11.85	24.86	13.64
0.46816	0.185	0.161	0.167	0.052	16.36	31.19	27.70	25.08
1.87266	0.121	0.122	0.123	0.052	55.79	55.66	54.91	55.46
Kontrola	0.214	0.201	0.222	0.054				
IC ₅₀ (nL/mL)					1661.10	1555.05	1507.15	1574.43 ±78.78
<i>J. oxycedrus</i> /šišarke								
0.00936	0.209	0.198	0.186	0.049	-1.45	5.68	12.86	9.27
0.01873	0.201	0.199	0.201	0.048	3.06	4.29	3.07	3.47
0.03745	0.221	0.221	0.205	0.053	-6.03	-6.26	4.17	4.17
0.18727	0.187	0.186	0.194	0.058	18.60	19.07	14.19	17.29
0.46816	0.169	0.185	0.184	0.080	43.87	33.21	34.11	37.06
0.93633	0.142	0.150	0.148	0.110	79.23	74.45	75.99	76.55
Kontrola	0.214	0.201	0.222	0.054				
IC ₅₀ (nL/mL)					547.28	629.09	633.80	603.39 ±48.65
<i>J. sabina</i> /iglice								
0.00936	0.173	0.176	0.184	0.045	-5.74	-8.14	-14.53	-9.47
0.01873	0.159	0.163	0.155	0.045	5.74	3.02	9.46	6.07
0.03745	0.153	0.134	0.134	0.048	13.02	28.64	28.52	23.40
0.18727	0.125	0.120	0.114	0.048	36.18	40.47	45.36	40.67
0.46816	0.101	0.110	0.099	0.047	55.45	48.41	57.56	53.81
0.93633	0.102	0.096	0.108	0.051	58.12	63.27	53.05	58.15
Kontrola	0.165	0.182	0.163	0.049				
IC ₅₀ (nL/mL)					383.80	369.93	287.22	376.87 ±9.81



Grafik 8.38. Zavisnost I_{LP} – radna koncentracija etarskog ulja
J. oxycedrus/iglice;
J. oxycedrus/šišarke;
J. sabina/iglice

Tabela 8.41. Inhibicija lipidne peroksidacije
(*J. sabina*/šišarke; *J. phoenicea*/iglice; *J. phoenicea*/šišarke – etarsko ulje)

Radna konc. (μL/mL)	Apsorbancija				Inhibicija lipidne peroksidacije (%)			
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁	RSC ₂	RSC ₃	Srednja vrednost
<i>J. sabina</i> /šišarke								
0.00936	0.116	0.128	0.145	0.048	43.56	33.20	19.12	31.96
0.01873	0.125	0.122	0.142	0.054	41.21	43.77	27.03	37.34
0.03745	0.139	0.129	0.124	0.054	29.73	38.16	42.15	36.68
0.18727	0.105	0.104	0.110	0.061	63.14	64.38	59.02	62.18
0.46816	0.098	0.097	0.100	0.049	60.12	61.03	58.15	59.77
0.93633	0.107	0.091	0.131	0.055	57.16	70.26	37.24	63.71
Kontrola	0.165	0.182	0.163	0.049				
IC ₅₀ (nL/mL)					141.64	66.39	70.13	68.26 ±2.64
<i>J. phoenicea</i> /iglice								
0.01873	0.167	0.171	0.139	0.046	14.11	10.80	34.06	19.66
0.03745	0.151	0.167	0.161	0.047	25.54	14.08	18.29	19.30
0.18727	0.133	0.123	0.160	0.050	40.48	47.60	21.38	36.49
0.46816	0.115	0.116	0.108	0.052	55.20	54.70	60.02	56.64
0.93633	0.104	0.112	0.107	0.051	62.20	56.48	60.30	59.66
1.87266	0.099	0.100	0.098	0.051	65.56	65.00	66.30	65.62
Kontrola	0.169	0.192	0.201	0.047				
IC ₅₀ (nL/mL)					328.76	262.64	537.31	295.70 ±46.75
<i>J. phoenicea</i> /šišarke								
0.00936	0.190	0.178	0.199	0.054	2.30	11.51	-3.91	6.91
0.03745	0.158	0.142	0.168	0.048	21.98	33.27	14.29	23.18
0.18727	0.133	0.159	0.134	0.048	39.54	20.54	39.07	39.54
0.46816	0.140	0.129	0.129	0.050	36.13	43.47	43.90	43.69
0.93633	0.120	0.123	0.119	0.048	48.49	46.50	49.32	48.10
1.87266	0.115	0.111	0.111	0.050	53.44	56.68	56.26	55.46
Kontrola	0.169	0.192	0.201	0.047				
IC ₅₀ (nL/mL)					902.31	791.45	899.37	864.38 ±63.17

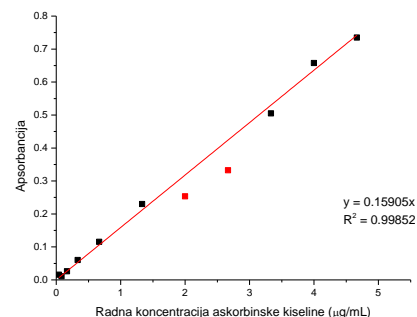


Grafik 8.39. Zavisnost I_{LP} – radna koncentracija etarskog ulja
J. sabina/šišarke;
J. phoenicea/iglice;
J. phoenicea/šišarke

8.2.6. Redukcioni potencijal (FRAP test)

Tabela 8.42. Kalibraciona kriva (redoks potencijal askorbinske kiseline)

Početna konc. ask. kiseline (µg/mL)	Radna konc. ask. kiseline (µg/mL)	Radna proba					A
		A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	A	
140	4.67	0.627	1.017	0.835	0.034	0.735	
120	4.00	0.758	0.764	0.740	0.039	0.658	
100	3.33	0.590	0.634	0.599	0.046	0.505	
80	2.67	0.448	0.428	0.400	0.036	0.332	
60	2.00	0.329	0.370	0.362	0.043	0.253	
40	1.33	0.348	0.301	0.317	0.035	0.23	
20	0.67	0.185	0.232	0.205	0.035	0.116	
10	0.33	0.158	0.165	0.140	0.037	0.06	
5	0.17	0.118	0.120	0.121	0.037	0.026	
2.5	0.08	0.106	0.108	0.111	0.040	0.011	
1.25	0.04	0.118	0.107	0.108	0.038	0.016	
Slepa proba	0.00	0.092	0.094	0.093	0.036	0.000	



Grafik 8.40. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje redoks potencijala ispitivanih ekstrakata: funkcija zavisnosti apsorbancije od koncentracije askorbinske kiseline

Tabela 8.43. Redukcioni potencijal ispitanih ekstrakata

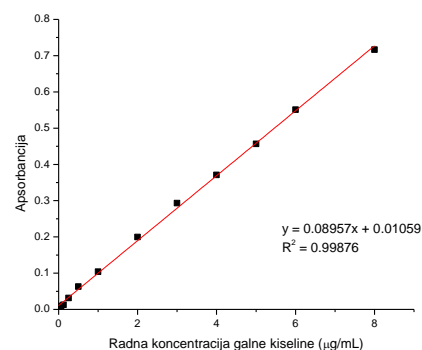
Određivanje redukcionog potencijala	Apsorbancije radne probe i korekcije						Ekv. konc. ask. kiseline (µg/mL)	µg ekv. ask. kiseline	mg suvog ekstrakta	mg ekv. ask. kiseline/ g suvog ekstrakta	
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	A _{sr}	A					
<i>J. communis</i>	iglice	0.322	0.312	0.350	0.046	0.328	0.201	1.263	0.379	0.005	75.76
		0.462	0.765	0.635	0.046	0.621	0.494	3.103	0.931	0.01	93.10
		0.897	1.150	1.408	0.050	1.152	1.021	6.417	1.925	0.02	96.25
<i>J. communis</i>	šišarke	0.175	0.191	0.182	0.046	0.183	0.055	0.347	0.104	0.005	20.80
		0.259	0.244	0.249	0.048	0.250	0.121	0.761	0.228	0.01	22.82
		0.362	0.416	0.394	0.052	0.391	0.258	1.624	0.487	0.02	24.36
<i>J. macrocarpa</i>	iglice	0.344	0.308	0.134	0.048	0.326	0.197	1.241	0.372	0.005	74.43
		0.459	0.529	0.597	0.047	0.528	0.400	2.516	0.755	0.01	75.47
		0.695	0.711	1.047	0.051	0.817	0.685	4.307	1.292	0.02	64.60
<i>J. macrocarpa</i>	šišarke	0.135	0.143	0.142	0.043	0.142	0.018	0.115	0.034	0.005	6.87
		0.144	0.146	0.153	0.045	0.145	0.019	0.121	0.036	0.01	3.63
		0.165	0.162	0.166	0.045	0.164	0.038	0.239	0.072	0.02	3.59
<i>J. excelsa</i>	iglice	0.457	0.490	0.526	0.043	0.491	0.367	2.307	0.692	0.005	138.42
		0.890	0.790	0.891	0.040	0.857	0.737	4.631	1.389	0.01	138.92

		1.376	1.347	1.433	0.041	1.386	1.264	7.946	2.384	0.02	119.19	
		0.322	0.363	0.382	0.038	0.356	0.237	1.488	0.446	0.005	89.29	
	šišarke	0.608	0.543	0.602	0.040	0.584	0.463	2.913	0.874	0.01	87.38	86.73±2.95
		0.957	0.994	1.068	0.040	1.006	0.885	5.567	1.670	0.02	83.51	
<i>J. sibirica</i>	iglice	0.357	0.372	0.424	0.036	0.385	0.268	1.682	0.505	0.005	100.93	
		0.689	0.629	0.705	0.039	0.675	0.555	3.489	1.047	0.01	104.66	103.77±2.51
		1.299	1.224	1.195	0.037	1.239	1.121	7.047	2.114	0.02	105.71	
	šišarke	0.203	0.225	0.187	0.040	0.205	0.084	0.531	0.159	0.005	31.87	
		0.290	0.269	0.275	0.037	0.278	0.160	1.007	0.302	0.01	30.21	32.08±1.98
		0.432	0.506	0.502	0.037	0.480	0.362	2.277	0.683	0.02	34.16	
<i>J. foetidissima</i>	iglice	0.552	0.590	0.605	0.039	0.582	0.462	2.907	0.872	0.005	174.42	
		1.109	1.124	1.182	0.040	1.138	1.018	6.398	1.919	0.01	191.95	177.70±12.92
		2.000	2.009	1.659	0.040	1.889	1.768	11.115	3.335	0.02	166.73	
	šišarke	0.391	0.531	0.543	0.039	0.489	0.368	2.315	0.695	0.005	138.92	
		0.872	0.877	0.812	0.040	0.854	0.732	4.604	1.381	0.01	138.13	135.31±5.57
		1.301	1.573	1.590	0.041	1.488	1.367	8.593	2.578	0.02	128.90	
<i>J. oxycedrus</i>	iglice	0.410	0.613	0.644	0.040	0.556	0.435	2.735	0.820	0.005	164.08	
		1.096	1.167	1.151	0.041	1.138	1.016	6.386	1.916	0.01	191.59	177.19±13.80
		1.948	2.056	1.960	0.042	1.988	1.865	11.727	3.518	0.02	175.90	
	šišarke	0.179	0.184	0.173	0.039	0.179	0.059	0.371	0.111	0.02	5.56	
		0.238	0.229	0.246	0.039	0.238	0.118	0.741	0.222	0.04	5.56	5.59±0.06
		0.362	0.346	0.374	0.039	0.361	0.240	1.510	0.453	0.08	5.66	
<i>J. sabina</i>	iglice	0.493	0.492	0.532	0.047	0.506	0.378	2.377	0.713	0.005	142.60	
		0.840	0.860	0.888	0.046	0.863	0.735	4.623	1.387	0.01	138.68	140.36±2.02
		1.669	1.687	1.487	0.051	1.614	1.482	9.319	2.796	0.02	139.79	
	šišarke	0.208	0.195	0.206	0.052	0.203	0.070	0.443	0.133	0.005	26.59	
		0.281	0.295	0.286	0.046	0.287	0.160	1.006	0.302	0.01	30.19	28.10±1.87
		0.414	0.386	0.453	0.045	0.417	0.292	1.833	0.550	0.02	27.50	
<i>J. phoenicea</i>	iglice	0.354	0.416	0.415	0.051	0.395	0.263	1.652	0.496	0.005	99.15	
		0.765	0.642	0.788	0.049	0.731	0.601	3.780	1.134	0.01	113.39	103.34±8.74
		1.159	1.143	1.188	0.049	1.163	1.034	6.499	1.950	0.02	97.49	
	šišarke	0.178	0.175	0.173	0.038	0.175	0.057	0.356	0.107	0.02	5.33	
		0.219	0.227	0.230	0.037	0.225	0.107	0.673	0.202	0.04	5.05	5.03±0.31
		0.334	0.322	0.322	0.045	0.326	0.200	1.258	0.378	0.08	4.72	
	slepa proba	0.118	0.118	0.120	0.038	0.119						

8.2.7. Sadržaj ukupnih fenola

Tabela 8.44. Kalibraciona kriva (ukupni fenoli)

Početna konc. galne kiseline (µg/mL)	Radna konc. galne kiseline (µg/mL)	Radna proba					A
		A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	A	
80	8.00	0.772	0.760	0.788	0.053	0.717	
60	6.00	0.606	0.599	0.602	0.047	0.551	
50	5.00	0.510	0.502	0.510	0.047	0.457	
40	4.00	0.425	0.412	0.421	0.044	0.371	
30	3.00	0.338	0.338	0.351	0.045	0.293	
20	2.00	0.252	0.250	0.255	0.049	0.200	
10	1.00	0.160	0.162	0.169	0.056	0.104	
5	0.50	0.109	0.112	0.113	0.044	0.063	
2.5	0.25	0.079	0.077	0.081	0.044	0.031	
1.25	0.13	0.069	0.065	0.065	0.049	0.013	
0.625	0.06	0.059	0.059	0.061	0.046	0.009	
slepa proba	0.00	0.054	0.053	0.055	0.049	0.000	



Grafik 8.41. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja ukupnih fenola u ispitivanim ekstraktima: funkcija zavisnosti apsorbancije od koncentracije galne kiseline

Tabela 8.45. Sadržaj ukupnih fenola u ispitivanim ekstraktima

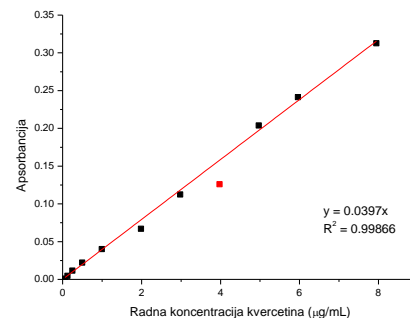
Određivanje sadržaja ukupnih fenola	Apsorbancije radne probe i korekcije						Ekv. konc. galne kiseline (µg/mL)	µg ekv. galne kiseline	mg suvog ekstrakta	mg ekv. galne kiseline/g suvog ekstrakta
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	A _{sr}	A				
<i>J. communis</i> iglice	0.205	0.192	0.185	0.049	0.194	0.129	1.323	0.397	0.00375	105.80
	0.408	0.385	0.386	0.053	0.393	0.325	3.505	1.052	0.0075	140.21
	0.719	0.681	0.666	0.057	0.689	0.615	6.751	2.025	0.015	135.02
<i>J. communis</i> šišarke	0.100	0.093	0.093	0.060	0.095	0.019	0.099	0.030	0.00375	7.90
	0.137	0.139	0.140	0.051	0.139	0.072	0.688	0.206	0.0075	27.52
	0.228	0.221	0.226	0.058	0.225	0.151	1.566	0.470	0.015	31.32
<i>J. macrocarpa</i> iglice	0.185	0.175	0.179	0.058	0.180	0.106	1.060	0.318	0.00375	84.81
	0.301	0.304	0.306	0.053	0.304	0.235	2.505	0.751	0.0075	100.18
	0.549	0.507	0.516	0.052	0.524	0.456	4.971	1.491	0.015	99.43
<i>J. macrocarpa</i> šišarke	0.175	0.179	0.188	0.054	0.180	0.110	1.112	0.334	0.03	11.12
	0.204	0.212	0.217	0.051	0.211	0.144	1.491	0.447	0.06	7.46
	0.304	0.334	0.333	0.050	0.324	0.258	2.758	0.827	0.12	6.89
<i>J. excelsa</i> iglice	0.307	0.299	0.308	0.054	0.305	0.234	2.497	0.749	0.00375	199.74
	0.466	0.471	0.480	0.052	0.472	0.404	4.393	1.318	0.0075	175.71
	0.771	0.809	0.786	0.051	0.789	0.721	7.933	2.380	0.015	158.67
<i>J. excelsa</i> šišarke	0.220	0.214	0.209	0.049	0.214	0.149	1.551	0.465	0.00375	124.05

		0.294	0.303	0.302	0.048	0.300	0.236	2.512	0.754	0.0075	100.48	
		0.463	0.478	0.487	0.051	0.476	0.409	4.447	1.334	0.015	88.94	
<i>J. sibirica</i>	iglice	0.265	0.286	0.309	0.082	0.287	0.188	1.983	0.595	0.00375	158.61	
		0.471	0.482	0.502	0.079	0.485	0.390	4.233	1.270	0.0075	169.33	155.92±14.94
		0.740	0.734	0.710	0.076	0.728	0.637	6.991	2.097	0.015	139.82	
<i>J. sibirica</i>	šišarke	0.149	0.140	0.140	0.049	0.143	0.078	0.749	0.225	0.00375	59.90	
		0.206	0.201	0.189	0.049	0.199	0.134	1.379	0.414	0.0075	55.14	54.68±5.46
		0.296	0.293	0.305	0.052	0.298	0.230	2.450	0.735	0.015	49.00	
<i>J. foetidissima</i>	iglice	0.323	0.344	0.341	0.049	0.336	0.271	2.905	0.872	0.00375	232.43	
		0.518	0.528	0.525	0.054	0.524	0.454	4.954	1.486	0.0075	198.17	196.07±2.97
		0.932	0.954	0.966	0.055	0.951	0.879	9.698	2.910	0.015	193.97	
<i>J. foetidissima</i>	šišarke	0.281	0.274	0.265	0.053	0.273	0.203	2.153	0.646	0.00375	172.22	
		0.418	0.438	0.423	0.051	0.426	0.360	3.899	1.170	0.0075	155.95	154.86±13.82
		0.681	0.694	0.693	0.052	0.689	0.621	6.820	2.046	0.015	136.40	
<i>J. oxycedrus</i>	iglice	0.295	0.286	0.294	0.053	0.291	0.223	2.371	0.711	0.00375	189.65	
		0.462	0.453	0.466	0.054	0.460	0.390	4.240	1.272	0.0075	169.60	171.43±17.38
		0.776	0.767	0.774	0.051	0.772	0.705	7.751	2.325	0.015	155.03	
<i>J. oxycedrus</i>	šišarke	0.113	0.106	0.099	0.049	0.106	0.041	0.345	0.103	0.00375	27.58	
		0.136	0.164	0.115	0.058	0.139	0.065	0.607	0.182	0.0075	24.28	25.93±2.34
		0.149	0.153	0.151	0.049	0.151	0.086	0.840	0.252	0.015	16.79	
<i>J. sabina</i>	iglice	0.249	0.247	0.230	0.047	0.242	0.179	1.878	0.563	0.00375	150.23	
		0.353	0.366	0.357	0.050	0.358	0.292	3.147	0.944	0.0075	125.86	119.56±8.91
		0.583	0.586	0.589	0.052	0.586	0.518	5.663	1.699	0.015	113.26	
<i>J. sabina</i>	šišarke	0.127	0.124	0.123	0.053	0.125	0.056	0.506	0.152	0.00375	40.46	
		0.154	0.154	0.160	0.048	0.156	0.092	0.909	0.273	0.0075	36.37	36.82±3.43
		0.228	0.231	0.224	0.051	0.228	0.161	1.682	0.505	0.015	33.64	
<i>J. phoenicea</i>	iglice	0.567	0.527	0.521	0.051	0.539	0.472	5.147	1.544	0.00375	411.74	
		0.311	0.306	0.304	0.049	0.307	0.242	2.588	0.776	0.0075	103.52	97.33±8.75
		0.475	0.479	0.497	0.049	0.484	0.419	4.557	1.367	0.015	91.14	
<i>J. phoenicea</i>	šišarke	0.117	0.118	0.103	0.061	0.113	0.035	0.276	0.083	0.00375	22.07	
		0.099	0.110	0.095	0.047	0.101	0.039	0.316	0.095	0.0075	12.65	11.96±0.98
		0.128	0.122	0.126	0.048	0.125	0.061	0.563	0.169	0.015	11.27	
	slepa proba	0.064	0.065	0.064	0.048	0.064						

8.2.8. Sadržaj ukupnih flavonoida

Tabela 8.46. Kalibraciona kriva (ukupni flavonoidi)

Početna konc. kvercetina (µg/mL)	Radna konc. kvercetina (µg/mL)	Radna proba					A
		A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	A	
80	7.947	0.517	0.483	0.424	0.162	0.313	
60	5.960	0.409	0.397	0.337	0.140	0.241	
50	4.967	0.353	0.339	0.284	0.122	0.204	
40	3.974	0.279	0.281	0.230	0.137	0.126	
30	2.980	0.205	0.206	0.175	0.083	0.113	
20	1.987	0.147	0.148	0.127	0.074	0.067	
10	0.993	0.093	0.094	0.103	0.057	0.040	
5	0.497	0.073	0.071	0.071	0.049	0.022	
2.5	0.248	0.065	0.058	0.055	0.048	0.012	
1.25	0.124	0.051	0.048	0.048	0.044	0.005	
0.625	0.062	0.046	0.045	0.044	0.044	0.001	
slepa proba	0.000	0.041	0.041	0.040	0.041	0.000	



Grafik 8.42. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida u ispitivanim ekstraktima: funkcija zavisnosti apsorbancije od koncentracije kvercetina

Tabela 8.47. Sadržaj ukupnih flavonoida u ispitivanim ekstraktima

Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida	Apsorbancije radne probe i korekcije						Ekv. konc. kvercetina (µg/mL)	µg ekv. kvercetina	mg suvog ekstrakta	mg ekv. kvercetina/g suvog ekstrakta
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	A _{sr}	A				
<i>J. communis</i> iglice	0.050	0.102	0.100	0.060	0.101	0.032	0.812	0.245	0.03	8.18
	0.171	0.163	0.157	0.084	0.167	0.073	1.848	0.558	0.06	9.30
	0.301	0.273	0.275	0.110	0.274	0.155	3.914	1.182	0.12	9.85
<i>J. communis</i> šišarke	0.078	0.085	0.083	0.056	0.082	0.017	0.434	0.131	0.03	4.37
	0.118	0.113	0.116	0.070	0.115	0.036	0.911	0.275	0.06	4.58
	0.183	0.189	0.186	0.088	0.186	0.090	2.255	0.681	0.12	5.67
<i>J. macrocarpa</i> iglice	0.088	0.092	0.092	0.057	0.090	0.025	0.618	0.187	0.03	6.22
	0.136	0.135	0.137	0.076	0.136	0.051	1.297	0.392	0.06	6.53
	0.228	0.235	0.228	0.106	0.230	0.115	2.901	0.876	0.12	7.30
<i>J. macrocarpa</i> šišarke	0.175	0.179	0.188	0.054	0.180	0.117	2.953	0.886	0.15	5.91
	0.204	0.212	0.217	0.051	0.211	0.151	3.807	1.142	0.3	3.81
	0.304	0.334	0.333	0.050	0.324	0.265	6.665	1.999	0.6	3.33
<i>J. excelsa</i> iglice	0.307	0.299	0.308	0.054	0.305	0.241	6.076	1.823	0.03	60.76
	0.466	0.471	0.480	0.052	0.472	0.411	10.354	3.106	0.06	51.77
	0.771	0.809	0.786	0.051	0.789	0.728	18.342	5.503	0.12	45.86
	0.196	0.186	0.190	0.049	0.191	0.133	3.345	1.004	0.03	33.45
<i>J. excelsa</i> šišarke	0.294	0.303	0.302	0.048	0.300	0.243	6.110	1.833	0.06	30.55
										30.54±2.92

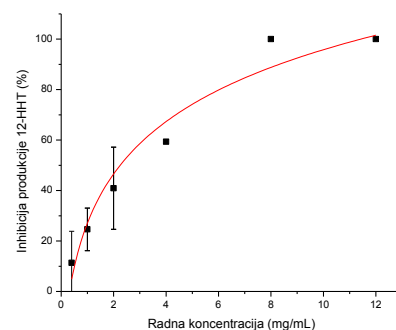
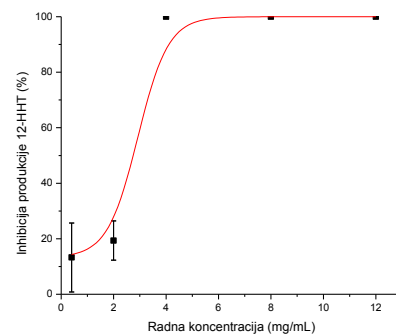
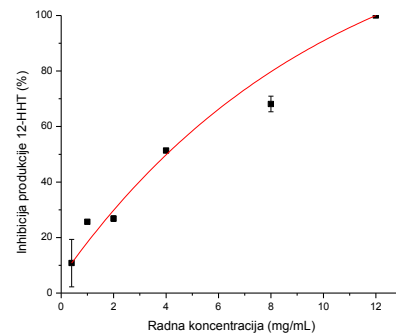
		0.501	0.498	0.497	0.051	0.498	0.439	11.047	3.314	0.12	27.62	
<i>J. sibirica</i>	iglice	0.126	0.141	0.142	0.074	0.136	0.053	1.340	0.405	0.03	13.49	
		0.219	0.221	0.227	0.096	0.222	0.117	2.939	0.887	0.06	14.79	14.59±1.01
		0.380	0.387	0.401	0.136	0.389	0.244	6.151	1.858	0.12	15.48	
	šišarke	0.100	0.100	0.104	0.066	0.102	0.027	0.672	0.203	0.03	6.77	
0.157		0.155	0.154	0.077	0.156	0.069	1.745	0.527	0.06	8.78	8.55±0.33	
0.240		0.255	0.249	0.108	0.248	0.131	3.302	0.997	0.12	8.31		
<i>J. foetidissima</i>	iglice	0.323	0.324	0.321	0.049	0.323	0.264	6.662	1.999	0.03	66.62	
		0.518	0.528	0.525	0.054	0.524	0.461	11.621	3.486	0.06	58.10	60.38±5.48
		0.932	0.954	0.966	0.055	0.960	0.896	22.560	6.768	0.12	56.40	
	šišarke	0.281	0.274	0.265	0.053	0.273	0.210	5.300	1.590	0.03	53.00	
0.418		0.438	0.423	0.051	0.426	0.367	9.239	2.772	0.06	46.20	49.60±4.81	
0.681		0.694	0.693	0.052	0.689	0.628	15.830	4.749	0.12	39.58		
<i>J. oxycedrus</i>	iglice	0.265	0.266	0.264	0.053	0.265	0.203	5.120	1.536	0.03	51.20	
		0.462	0.453	0.466	0.054	0.460	0.397	10.009	3.003	0.06	50.05	48.76±3.28
		0.776	0.777	0.774	0.051	0.775	0.715	18.015	5.405	0.12	45.04	
	šišarke	0.113	0.106	0.099	0.049	0.103	0.045	1.130	0.339	0.03	11.30	
0.124		0.116	0.115	0.058	0.119	0.052	1.309	0.393	0.06	6.54	6.25±0.42	
0.154		0.153	0.151	0.049	0.153	0.094	2.379	0.714	0.12	5.95		
<i>J. sabina</i>	iglice	0.133	0.127	0.132	0.083	0.131	0.038	0.968	0.290	0.03	9.68	
		0.198	0.187	0.179	0.112	0.188	0.067	1.677	0.503	0.06	8.38	8.93±0.67
		0.291	0.294	0.294	0.146	0.293	0.138	3.487	1.046	0.12	8.72	
	šišarke	0.233	0.232	0.227	0.095	0.231	0.126	3.179	0.954	0.03	31.79	
0.363		0.365	0.383	0.123	0.370	0.239	6.013	1.804	0.06	30.06	32.01±2.07	
0.681		0.711	0.725	0.153	0.705	0.543	13.676	4.103	0.12	34.19		
<i>J. phoenicea</i>	iglice	0.082	0.078	0.082	0.069	0.081	0.003	0.067	0.020	0.03	0.67	
		0.110	0.109	0.110	0.074	0.110	0.026	0.661	0.198	0.06	3.31	3.32±0.03
		0.174	0.163	0.164	0.105	0.167	0.053	1.337	0.401	0.12	3.34	
	šišarke	0.117	0.118	0.103	0.061	0.113	0.042	1.066	0.320	0.03	10.66	
0.099		0.110	0.095	0.047	0.101	0.046	1.157	0.347	0.06	5.78	6.21±0.60	
0.156		0.164	0.168	0.048	0.163	0.105	2.654	0.796	0.12	6.64		
	slepa proba	0.050	0.050	0.050	0.041	0.050						

8.3. Antiinflamatorni potencijal

8.3.1. Potencijal inhibicije produkcije 12-HHT

Tabela 8.48. Potencijal inhibicije produkcije 12-HHT
(*J. communis*/iglice; *J. macrocarpa*/šišarke; *J. excelsa*/iglice - ekstrakti)

Radna konc. (mg/mL)	12-HHT/PGB ₂				Inhibicija produkcije 12-HHT (%)			Srednja vrednost
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	
<i>J. communis</i> /iglice								
0.4	0.173	0.125	0.143	0.000	-15.52	16.82	4.76	10.79
1.0	0.178	0.174	0.112	0.000	-18.57	-16.31	25.65	25.65
2.0	0.187	0.109	0.111	0.000	-24.44	27.50	26.10	26.80
4.0	0.000	0.073	0.073	0.000	100.0	51.32	51.34	51.33
8.0	0.053	0.045	0.051	0.000	64.39	70.10	66.13	68.11
12.0	0.028	0.000	0.000	0.000	81.06	100.0	100.0	100.0
Kontrola	0.180	0.168	0.101	0.000	-15.52	16.82	4.76	
IC ₅₀ (mg/mL)					-	4.20	4.46	4.33 ±0.18
<i>J. macrocarpa</i> /šišarke								
0.4	0.104	0.139	0.128	0.000	26.94	2.69	10.15	13.26
1.0	0.293	0.339	0.167	0.000	-105.23	-137.26	-16.55	-86.35
2.0	0.119	0.104	0.123	0.000	16.65	27.38	14.02	19.35
4.0	0.097	0.000	0.000	0.000	31.89	100.0	100.0	100.0
8.0	0.000	0.000	0.000	0.000	100.0	100.0	100.0	100.0
12.0	0.000	0.000	0.000	0.000	100.0	100.0	100.0	100.0
Kontrola	0.154	0.111	0.163	0.000				
IC ₅₀ (mg/mL)					2.48	2.12	2.16	2.25 ±0.20
<i>J. excelsa</i> /iglice								
0.4	0.206	0.151	0.195	0.000	11.35	34.94	16.11	11.35
1.0	0.163	0.164	0.198	0.000	29.69	29.30	14.86	24.62
2.0	0.183	0.164	0.110	0.000	21.25	29.34	52.48	40.91
4.0	0.136	0.297	0.000	0.042	59.37	-10.00	118.15	59.37
8.0	0.000	0.000	0.000	0.000	100.0	100.0	100.0	100.0
12.0	0.000	0.000	0.000	0.000	100.0	100.0	100.0	100.0
Kontrola	0.195	0.159	0.341	0.000				
IC ₅₀ (mg/mL)					2.77	2.72	1.97	2.74 ±0.03

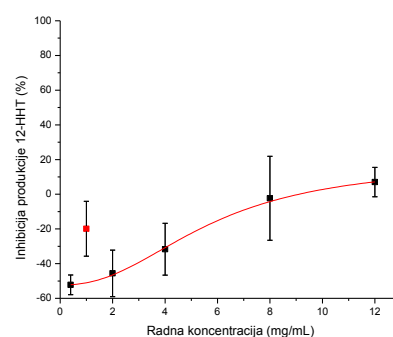
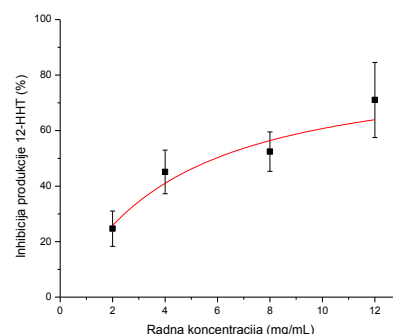
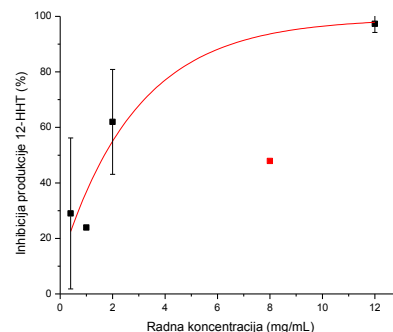


Grafik 8.43. Zavisnost inhibicije produkcije 12-HHT (%) – radna koncentracija ekstrakta *J. communis*/iglice; *J. macrocarpa*/šišarke; *J. excelsa*/iglice

Tabela 8.49. Potencijal inhibicije produkcije 12-HHT (*J. excelsa*/šišarke; *J. sibirica*/iglice; *J. sibirica*/šišarke - ekstrakti)

Radna konc. (mg/mL)	12-HHT/PGB ₂				Inhibicija produkcije 12-HHT (%)			Srednja vrednost
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	
<i>J. excelsa</i> /šišarke								
0.4	0.174	0.293	0.204	0.084	61.19	9.76	48.24	29.00
1.0	0.176	0.266	0.046	0.000	23.94	-14.71	80.02	23.94
2.0	0.051	0.136	0.078	0.000	78.23	41.22	66.48	61.98
4.0	0.212	0.190	0.206	0.000	8.43	17.90	11.19	12.51
8.0	0.106	0.101	0.121	0.000	54.51	56.61	47.90	47.90
12.0	0.061	0.051	0.064	0.052	96.18	100.84	94.93	97.32
Kontrola	0.195	0.159	0.341	0.000				
IC ₅₀ (mg/mL)					1.23	4.29	1.92	1.57 ±0.49
<i>J. sibirica</i> /iglice								
0.4	0.377	0.214	0.245	0.000	-136.89	-34.87	-54.21	-75.32
1.0	0.168	0.214	0.223	0.000	-5.47	-34.29	-40.12	-26.62
2.0	0.127	0.159	0.113	0.000	20.17	-0.06	29.15	24.66
4.0	0.078	0.096	0.144	0.000	50.65	39.53	9.39	45.09
8.0	0.063	0.080	0.084	0.000	60.53	49.56	47.23	52.44
12.0	0.062	0.022	0.055	0.000	61.24	86.45	65.40	71.03
Kontrola	0.155	0.179	0.144	0.000				
IC ₅₀ (mg/mL)					4.84	5.65	7.00	6.32 ±0.95
<i>J. sibirica</i> /šišarke								
0.4	0.236	0.252	0.238	0.000	-48.54	-58.76	-49.39	-52.23
1.0	0.297	0.208	0.173	0.000	-86.83	-31.09	-8.74	-19.92
2.0	0.211	0.254	0.230	0.000	-32.83	-59.56	-44.42	-45.60
4.0	0.235	0.205	0.188	0.000	-47.87	-28.92	-18.36	-31.72
8.0	0.249	0.135	0.190	0.000	-56.83	14.79	-19.45	-2.33
12.0	0.161	0.134	0.148	0.000	-1.52	15.50	7.11	7.03
Kontrola	0.155	0.179	0.144	0.000				
IC ₅₀ (mg/mL)					n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

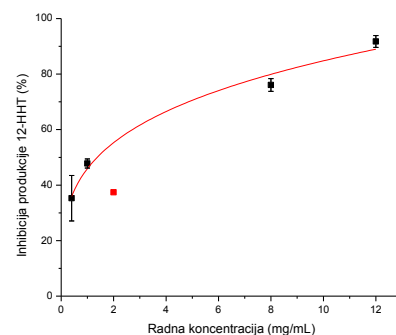
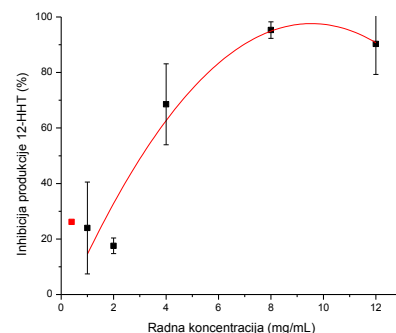
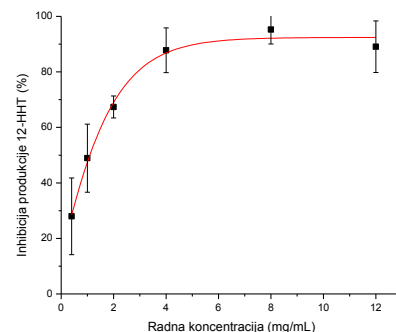
n.d. - IC₅₀ nije dostignuta



Grafik 8.44. Zavisnost inhibicije produkcije 12-HHT (%) – radna koncentracija ekstrakta *J. excelsa*/šišarke; *J. sibirica*/iglice; *J. sibirica*/šišarke

Tabela 8.50. Potencijal inhibicije produkcije 12-HHT
(*J. foetidissima*/iglice; *J. foetidissima*/šišarke; *J. sabina*/iglice - ekstrakti)

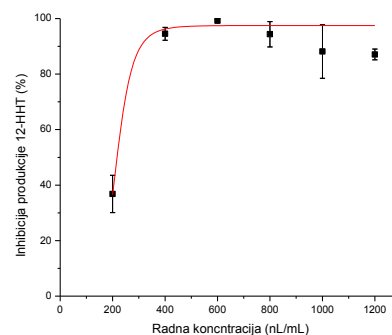
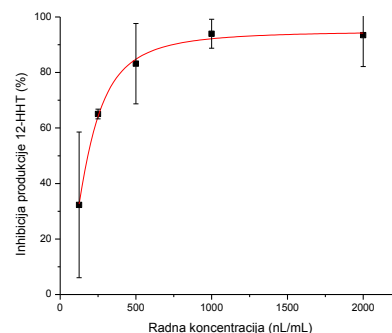
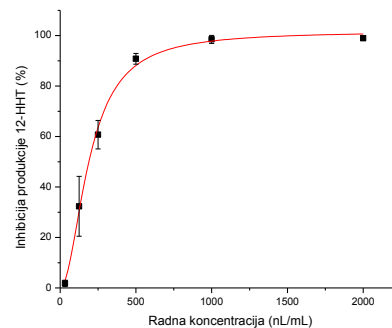
Radna konc. (mg/mL)	12-HHT/PGB ₂				Inhibicija produkcije 12-HHT (%)			
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	Srednja vrednost
<i>J. foetidissima</i> /iglice								
0.4	0.215	0.283	0.285	0.053	43.94	20.42	19.58	27.98
1.0	0.121	0.134	0.188	0.000	58.03	53.76	34.99	48.92
2.0	0.088	0.107	0.088	0.000	69.65	62.81	69.62	67.36
4.0	0.141	0.054	0.087	0.035	63.27	93.46	82.07	87.77
8.0	0.084	0.063	0.070	0.060	91.58	98.89	96.62	95.24
12.0	0.051	0.036	0.088	0.027	91.64	96.79	78.77	89.07
Kontrola	0.250	0.873	0.569	0.432				
IC ₅₀ (mg/mL)					0.60	1.04	1.23	1.13 ±0.13
<i>J. foetidissima</i> /šišarke								
0.4	0.205	0.455	0.302	0.089	59.62	-26.59	26.17	26.17
1.0	0.207	0.273	0.180	0.000	28.48	5.63	37.84	23.98
2.0	0.233	0.244	0.255	0.000	19.53	15.57	11.88	17.55
4.0	0.165	0.276	0.225	0.104	78.87	40.75	58.25	68.56
8.0	0.084	0.068	0.072	0.061	91.96	97.68	96.26	95.30
12.0	0.054	0.024	0.087	0.027	90.70	101.0	79.11	90.27
Kontrola	0.250	0.873	0.569	0.432				
IC ₅₀ (mg/mL)					2.67	3.35	2.99	3.17 ±0.25
<i>J. sabina</i> /iglice								
0.4	0.197	0.209	0.225	0.100	43.05	36.03	26.75	35.28
1.0	0.153	0.148	0.151	0.062	46.30	49.55	47.53	47.79
2.0	0.107	0.107	0.140	0.000	37.43	37.27	18.24	30.98
4.0	0.114	0.107	0.095	0.000	33.30	37.34	44.21	38.29
8.0	0.049	0.054	0.057	0.013	78.55	75.66	74.02	76.08
12.0	0.051	0.049	0.056	0.038	92.61	93.33	89.31	91.75
Kontrola	0.152	0.185	0.177	0.000				
IC ₅₀ (mg/mL)					1.66	1.26	1.47	1.46 ±0.20



Grafik 8.45. Zavisnost inhibicije produkcije 12-HHT (%) – radna koncentracija ekstrakta *J. foetidissima*/iglice; *J. foetidissima*/šišarke; *J. sabina*/iglice

Tabela 8.51. Potencijal inhibicije produkcije 12-HHT
(*J. communis*/iglice; *J. communis*/šišarke; *J. macrocarpa*/šišarke – etarsko ulje)

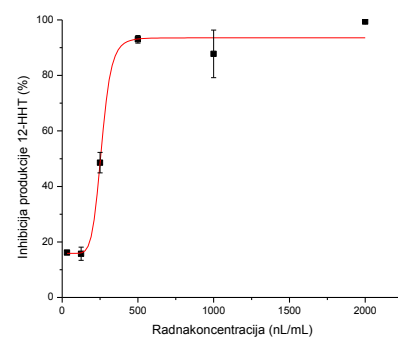
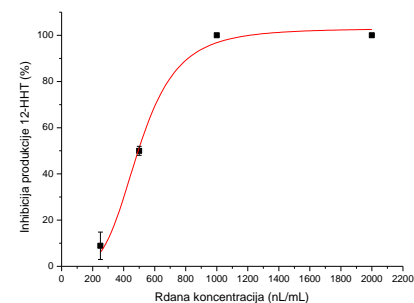
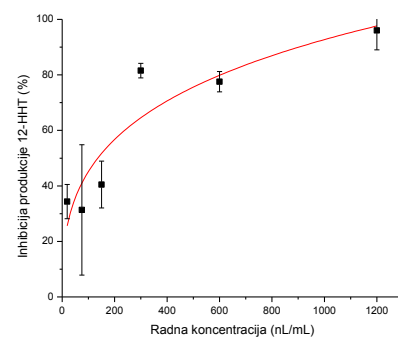
Radna konc. (nL/mL)	12-HHT/PGB ₂				Inhibicija produkcije 12-HHT (%)			Srednja vrednost
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	
<i>J. communis</i> /iglice								
32.0	0.374	0.382	0.382	0.000	3.23	1.13	1.05	1.80
125.0	0.328	0.253	0.245	0.014	18.72	38.14	40.18	32.34
250.0	0.143	0.135	0.176	0.000	62.99	64.92	54.28	60.73
500.0	0.032	0.045	0.029	0.000	91.66	88.39	92.42	90.82
1000.0	0.048	0.036	0.041	0.036	96.84	100.00	98.66	98.50
2000.0	0.027	0.025	0.022	0.021	98.35	98.86	99.64	98.95
Kontrola	0.315	0.391	0.451	0.000				
IC ₅₀ (nL/mL)					207.34	171.45	184.74	187.84 ±18.15
<i>J. communis</i> /šišarke								
32.0	0.326	0.281	0.290	0.000	-22.16	-5.15	-8.46	-11.92
125.0	0.320	0.198	0.200	0.059	1.98	47.77	47.14	32.29
250.0	0.117	0.121	0.126	0.028	66.82	65.05	63.29	65.05
500.0	0.045	0.121	0.072	0.035	96.03	67.49	86.05	83.19
1000.0	0.025	0.025	0.049	0.017	96.99	96.93	87.94	93.96
2000.0	0.052	0.000	0.000	0.000	80.40	100.00	100.00	93.47
Kontrola	0.249	0.311	0.240	0.000				
IC ₅₀ (nL/mL)					224.37	138.95	141.46	140.21 ±1.77
<i>J. macrocarpa</i> /šišarke								
200.0	0.341	0.396	0.405	0.053	44.52	33.77	32.17	36.82
400.0	0.096	0.181	0.198	0.161	112.65	96.17	92.89	94.53
600.0	0.110	0.104	0.000	0.103	98.73	99.77	119.88	99.25
800.0	0.118	0.071	0.100	0.067	90.24	99.27	93.58	94.36
1000.0	0.176	0.102	0.081	0.058	77.24	91.63	95.53	88.13
1200.0	0.089	0.091	0.073	0.017	86.16	85.79	89.30	87.08
Kontrola	0.468	0.569	0.571	0.000				
IC ₅₀ (nL/mL)					209.69	230.44	208.25	216.13 ±12.42



Grafik 8.46. Zavisnost inhibicije produkcije 12-HHT (%) – radna koncentracija etarskog ulja *J. communis*/iglice; *J. communis*/šišarke; *J. macrocarpa*/šišarke

Tabela 8.52. Potencijal inhibicije produkcije 12-HHT
(*J. excelsa*/iglice; *J. excelsa*/šišarke; *J. sibirica*/iglice – etarsko ulje)

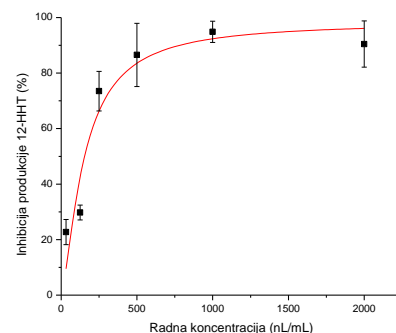
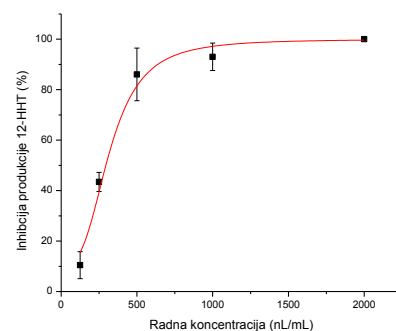
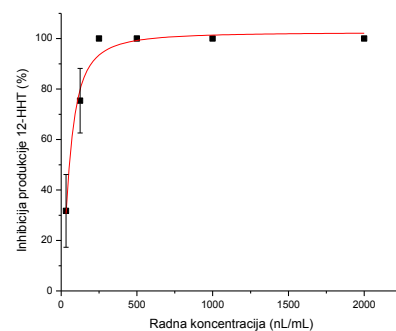
Radna konc. (nL/mL)	12-HHT/PGB ₂				Inhibicija produkcije 12-HHT (%)			Srednja vrednost
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	
<i>J. excelsa</i> /iglice								
19.24	0.412	0.729	0.470	0.000	38.73	-8.51	30.01	34.37
75.0	0.347	0.646	0.586	0.065	57.96	13.59	22.49	31.35
150.0	0.463	0.352	0.385	0.000	31.16	47.63	42.68	40.49
300.0	0.104	0.137	0.131	0.000	84.50	79.55	80.56	81.53
600.0	0.179	0.135	0.138	0.000	73.35	79.89	79.41	77.55
1200.0	0.000	0.000	0.081	0.000	100.00	100.00	87.97	95.99
Kontrola	0.665	0.720	0.632	0.000				
IC ₅₀ (nL/mL)					87.92	160.23	149.16	154.70 ±7.83
<i>J. excelsa</i> /šišarke								
32.0	0.845	0.416	0.602	0.000	-169.10	-32.45	-91.73	-97.76
125.0	0.426	0.440	0.372	0.000	-35.60	-40.05	-18.34	-31.33
250.0	0.435	0.421	0.458	0.152	9.77	14.37	2.61	8.92
500.0	0.150	0.159	0.162	0.000	52.14	49.43	48.36	49.98
1000.0	0.000	0.000	0.000	0.000	100.00	100.00	100.00	100.00
2000.0	0.000	0.000	0.000	0.000	100.00	100.00	100.00	100.00
Kontrola	0.486	0.690	0.496	0.244				
IC ₅₀ (nL/mL)					482.57	485.11	505.14	490.94 ±12.36
<i>J. sibirica</i> /iglice								
32.0	0.530	0.879	0.900	0.000	16.19	-30.85	-33.93	16.19
125.0	0.674	0.555	0.577	0.000	-6.71	17.43	14.08	15.75
250.0	0.364	0.386	0.428	0.054	50.90	50.51	44.30	48.57
500.0	0.269	0.275	0.289	0.231	94.00	93.56	91.45	93.00
1000.0	0.122	0.228	0.216	0.107	97.62	81.90	83.80	87.78
2000.0	0.120	0.114	0.116	0.113	98.88	99.85	99.54	99.42
Kontrola	0.665	0.720	0.632	0.000				
IC ₅₀ (nL/mL)					247.55	235.12	257.76	246.81 ±11.34



Grafik 8.47. Zavisnost inhibicije produkcije 12-HHT (%) – radna koncentracija etarskog ulja *J. excelsa*/iglice; *J. excelsa*/šišarke; *J. sibirica*/iglice

Tabela 8.53. Potencijal inhibicije produkcije 12-HHT
(*J. foetidissima*/iglice; *J. foetidissima*/šišarke; *J. oxycedrus*/iglice – etarsko ulje)

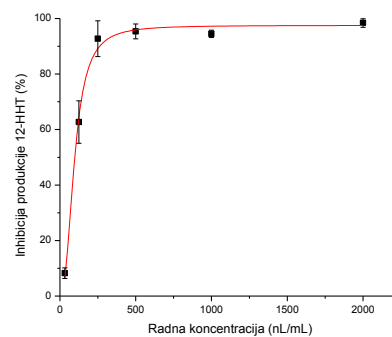
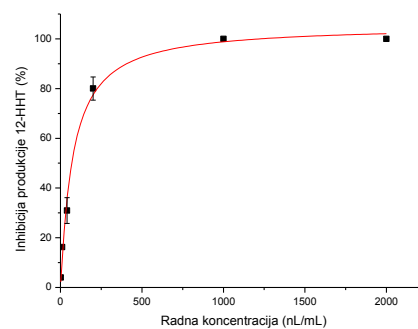
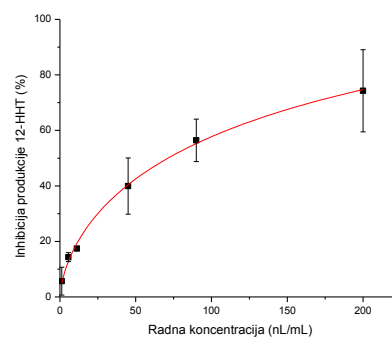
Radna konc. (nL/mL)	12-HHT/PGB ₂				Inhibicija produkcije 12-HHT (%)			
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	Srednja vrednost
<i>J. foetidissima</i> /iglice								
32.0	0.205	0.142	0.147	0.000	15.10	40.97	39.05	31.71
125.0	0.062	0.089	0.027	0.000	74.16	63.23	88.79	75.39
250.0	0.000	0.000	0.000	0.000	100.0	100.0	100.0	100.0
500.0	0.000	0.000	0.000	0.000	100.0	100.0	100.0	100.0
1000.0	0.000	0.000	0.000	0.000	100.0	100.0	100.0	100.0
2000.0	0.000	0.000	0.000	0.000	100.0	100.0	100.0	100.0
Kontrola	0.192	0.323	0.209	0.000				
IC ₅₀ (nL/mL)					73.67	50.05	40.59	45.32 ±6.69
<i>J. foetidissima</i> /šišarke								
32.0	1.254	1.348	1.607	0.000	-10.99	-19.29	-42.21	-24.16
125.0	1.259	1.003	1.088	0.034	-8.41	14.23	6.67	10.45
250.0	0.686	0.630	0.601	0.000	39.34	44.20	46.81	43.45
500.0	0.366	0.280	0.134	0.102	76.65	84.30	97.23	86.06
1000.0	0.102	0.224	0.152	0.081	98.08	87.28	93.72	93.03
2000.0	0.000	0.000	0.000	0.000	100.0	100.0	100.0	100.0
Kontrola	1.163	1.282	0.944	0.000				
IC ₅₀ (nL/mL)					301.5	267.74	255.12	274.79 ±23.98
<i>J. oxycedrus</i> /iglice								
32.0	0.186	0.198	0.176	0.000	23.00	18.04	27.11	22.72
125.0	0.175	0.162	0.171	0.000	27.57	32.77	28.95	29.76
250.0	0.083	0.101	0.117	0.037	80.72	73.31	66.47	73.50
500.0	0.057	0.074	0.111	0.048	96.33	89.28	74.05	86.55
1000.0	0.063	0.072	0.081	0.059	98.65	94.89	91.05	94.86
2000.0	0.000	0.032	0.037	0.000	100.00	86.68	84.71	90.46
Kontrola	0.192	0.323	0.209	0.000				
IC ₅₀ (nL/mL)					164.56	158.46	165.89	162.97 ±3.96



Grafik 8.48. Zavisnost inhibicije produkcije 12-HHT (%) – radna koncentracija etarskog ulja
J. foetidissima/iglice;
J. foetidissima/šišarke;
J. oxycedrus/iglice

Tabela 8.54. Potencijal inhibicije produkcije 12-HHT
(*J. oxycedrus*/šišarke; *J. sabina*/iglice; *J. phoenicea*/iglice – etarsko ulje)

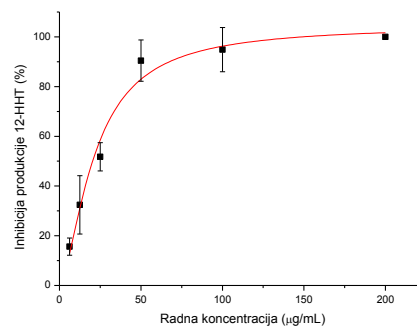
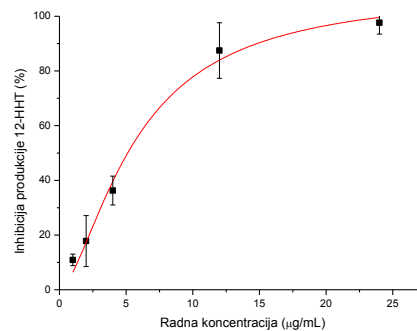
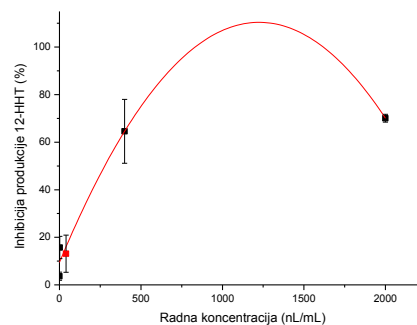
Radna konc. (nL/mL)	12-HHT/PGB ₂				Inhibicija produkcije 12-HHT (%)			Srednja vrednost
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	
<i>J. oxycedrus</i> /šišarke								
1.2	0.843	0.873	0.935	0.000	10.04	6.79	0.19	5.67
5.6	0.813	0.792	0.793	0.000	13.19	15.45	15.33	14.32
11.2	0.774	1.462	1.247	0.000	17.43	-56.04	-33.13	17.43
45.0	0.630	0.649	0.495	0.000	32.77	30.70	47.12	39.94
90.0	0.490	0.376	0.358	0.000	47.67	59.83	61.80	56.44
200.0	0.230	0.377	0.507	0.130	89.38	73.69	59.79	74.29
Kontrola	0.801	1.055	0.955	0.000				
IC ₅₀ (nL/mL)					91.73	54.31	61.53	57.92 ±5.10
<i>J. sabina</i> /iglice								
2.0	1.319	0.992	0.899	0.000	-40.73	-5.87	4.01	4.01
10.0	0.949	0.611	0.785	0.000	-1.30	34.83	16.23	16.23
40.0	0.614	0.624	0.703	0.000	34.42	33.41	25.01	30.95
200.0	0.190	0.265	0.268	0.054	85.42	77.50	77.15	80.02
1000.0	0.000	0.000	0.000	0.000	100.0	100.0	100.0	100.0
2000.0	0.000	0.000	0.000	0.000	100.0	100.0	100.0	100.0
Kontrola	0.801	1.055	0.955	0.000				
IC ₅₀ (nL/mL)					61.87	72.03	81.90	71.93 ±10.01
<i>J. phoenicea</i> /iglice								
32.0	0.241	0.251	0.243	0.000	9.62	6.05	9.09	8.25
125.0	0.135	0.156	0.176	0.056	70.43	62.59	55.12	62.71
250.0	0.057	0.081	0.120	0.050	97.29	88.20	73.55	92.74
500.0	0.030	0.027	0.041	0.020	96.27	97.45	92.36	95.36
1000.0	0.031	0.026	0.024	0.012	93.09	94.74	95.68	94.50
2000.0	0.023	0.032	0.025	0.022	99.76	96.62	99.01	98.46
Kontrola	0.249	0.311	0.240	0.000				
IC ₅₀ (nL/mL)					84.31	100.41	111.93	106.17 ±8.15



Grafik 8.49. Zavisnost inhibicije produkcije 12-HHT (%) – radna koncentracija etarskog ulja *J. oxycedrus*/šišarke; *J. sabina*/iglice; *J. phoenicea*/iglice

Tabela 8.55. Potencijal inhibicije produkcije 12-HHT (*J. phoenicea*/šišarke; aspirin; kvercetin – etarsko ulje; standard)

Radna konc. (nL/mL; μg/mL)	12-HHT/PGB ₂				Inhibicija produkcije 12-HHT (%)			Srednja vrednost
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	
<i>J. phoenicea</i> /šišarke								
0.2	1.041	1.044	1.011	0.017	2.82	2.50	5.62	3.65
2.0	0.853	0.923	0.891	0.000	19.03	12.40	15.43	15.72
10.0	1.156	1.321	1.331	0.000	-9.66	-25.33	-26.29	-20.43
40.0	1.044	1.117	0.927	0.070	7.57	0.65	18.65	13.11
400.0	0.595	0.439	0.312	0.075	50.70	65.52	77.53	64.58
2000.0	0.322	0.347	0.355	0.026	71.92	69.55	68.74	70.07
Kontrola	1.094	1.345	0.884	0.054				
IC ₅₀ (nL/mL)					399.10	276.57	220.54	248.55 ±39.62
aspirin								
0.4	0.035	0.033	0.024	0.000	96.68	96.90	97.77	97.12
1.0	0.957	0.914	0.946	0.000	9.24	13.28	10.21	10.91
2.0	0.782	0.974	0.843	0.000	25.80	7.55	20.02	17.79
4.0	0.731	0.711	0.632	0.000	30.64	32.54	40.02	36.28
12.0	0.253	0.096	0.048	0.000	76.02	90.90	95.47	87.46
24.0	0.075	0.000	0.000	0.000	92.88	100.0	100.0	97.63
Kontrola	1.094	1.345	0.884	0.054				
IC ₅₀ (μg/mL)					5.06	5.36	4.51	4.98 ±0.43
kvercetin								
6.24	0.199	0.198	0.213	0.000	17.32	17.92	11.65	15.63
12.48	0.143	0.114	0.183	0.000	40.72	52.58	24.15	32.44
25.0	0.129	0.119	0.102	0.000	46.65	50.68	57.88	51.74
50.0	0.000	0.036	0.033	0.000	100.0	85.06	86.27	90.44
100.0	0.000	0.000	0.037	0.000	100.0	100.0	84.58	94.86
200.0	0.000	0.000	0.000	0.000	100.0	100.0	100.0	100.0
Kontrola	0.288	0.201	0.236	0.000				
IC ₅₀ (μg/mL)					24.90	21.30	21.15	22.45 ±2.12



Grafik 8.50. Zavisnost inhibicije produkcije 12-HHT (%) – radna koncentracija etarskog ulja ili standarda *J. phoenicea*/šišarke; aspirin; kvercetin

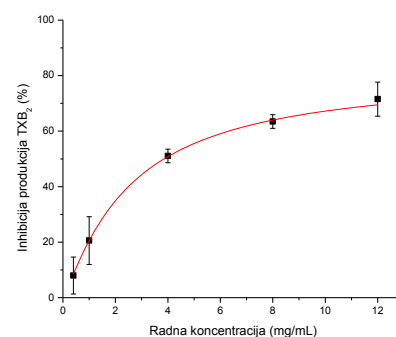
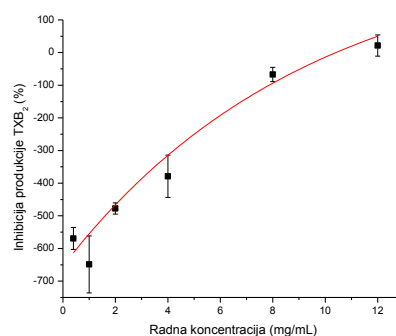
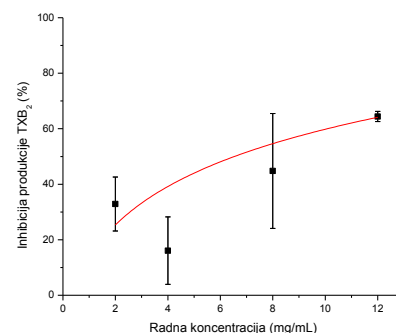
8.3.2. Potencijal inhibicije produkcije TXB₂

Tabela 8.56. Potencijal inhibicije produkcije TXB₂

(*J. communis*/iglice; *J. macrocarpa*/šišarke; *J. sibirica*/iglice - ekstrakti)

Radna konc. (mg/mL)	TXB ₂ /PGB ₂				Inhibicija produkcije TXB ₂ (%)			Srednja vrednost
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	
<i>J. communis</i> /iglice								
0.4	0.401	0.358	0.309	0.011	-38.06	-22.74	-5.49	-22.10
1.0	0.393	0.570	0.424	0.045	-23.19	-86.17	-34.25	-47.87
2.0	0.310	0.279	0.255	0.092	22.71	33.87	42.06	32.88
4.0	0.273	0.238	0.307	0.036	15.88	28.31	4.03	16.07
8.0	0.243	0.203	0.128	0.036	26.44	40.68	67.22	44.78
12.0	0.134	0.125	0.126	0.028	62.29	65.65	65.27	64.40
Kontrola	0.299	0.400	0.323	0.058				
IC ₅₀ (mg/mL)					10.67	8.06	6.90	7.48 ±0.82
<i>J. macrocarpa</i> /šišarke								
0.4	0.397	3.456	3.703	0.119	46.31	-545.32	-593.09	-569.21
1.0	4.359	3.509	4.198	0.150	-714.06	-549.70	-682.96	-648.91
2.0	-	3.256	3.131	0.208	-	-489.72	-465.49	-477.61
4.0	2.903	2.295	2.359	0.043	-453.09	-335.55	-348.00	-378.88
8.0	0.912	0.912	1.108	0.114	-54.50	-54.44	-92.26	-67.07
12.0	0.703	0.434	0.394	0.104	-15.76	36.35	43.93	21.50
Kontrola	0.647	0.524	0.476	0.032				
IC ₅₀ (mg/mL)					n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>J. sibirica</i> /iglice								
0.4	0.576	0.599	0.651	0.072	13.62	9.65	0.61	7.96
1.0	0.600	0.559	0.489	0.061	7.47	14.50	26.65	20.57
2.0	0.515	0.389	0.372	0.068	23.24	44.94	47.77	38.65
4.0	0.405	0.377	0.396	0.108	48.96	53.79	50.49	51.08
8.0	0.320	0.314	0.293	0.096	61.53	62.58	66.21	63.44
12.0	0.308	0.253	0.241	0.101	64.54	74.02	76.03	71.53
Kontrola	0.503	0.797	0.595	0.049				
IC ₅₀ (mg/mL)					4.12	3.85	3.62	3.86 ±0.25

n.d. - IC₅₀ nije dostignuta

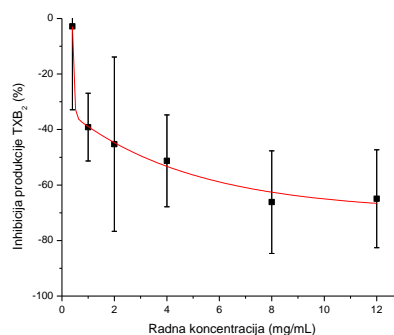
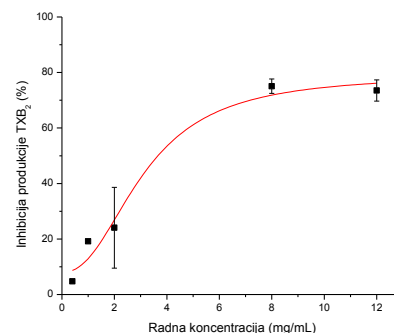
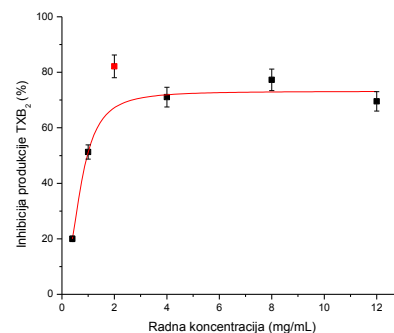


Grafik 8.51. Zavisnost inhibicije produkcije TXB₂ (%) – radna koncentracija ekstrakta *J. communis*/iglice; *J. macrocarpa*/šišarke; *J. sibirica*/iglice

Tabela 8.57. Potencijal inhibicije produkcije TXB₂
(*J. foetidissima*/iglice; *J. foetidissima*/šišarke; *J. oxycedrus*/šišarke - ekstrakti)

Radna konc. (mg/mL)	TXB ₂ /PGB ₂				Inhibicija produkcije TXB ₂ (%)			Srednja vrednost
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	
<i>J. foetidissima</i> /iglice								
0.4	2.074	1.545	2.000	0.110	16.85	39.26	19.98	25.36
1.0	0.861	0.751	1.218	0.067	66.39	71.04	51.26	62.90
2.0	1.842	0.448	0.459	0.037	23.58	82.62	82.13	82.62
4.0	0.835	0.775	0.786	0.102	68.97	71.51	71.04	70.01
8.0	0.760	0.655	0.801	0.265	79.02	83.47	77.28	79.93
12.0	0.718	0.809	0.946	0.226	79.19	75.32	69.52	74.67
Kontrola	3.550	7.028	7.323	3.605				
IC ₅₀ (mg/mL)					0.62	0.91	0.96	0.93 ±0.03
<i>J. foetidissima</i> /šišarke								
0.4	1.659	2.250	2.250	0.000	29.74	4.74	4.74	4.74
1.0	2.101	3.260	2.940	0.191	19.15	-29.93	-16.39	19.15
2.0	1.686	1.696	2.286	0.096	32.67	32.24	7.28	24.06
4.0	2.338	3.528	3.308	0.226	10.57	-39.77	-30.49	-19.90
8.0	0.760	0.703	0.825	0.174	75.17	77.60	72.40	75.06
12.0	0.756	0.865	0.935	0.226	77.56	72.94	69.97	73.49
Kontrola	3.550	7.028	7.323	3.605				
IC ₅₀ (mg/mL)					3.31	3.30	5.22	3.30 ±0.01
<i>J. oxycedrus</i> /šišarke								
0.4	0.726	0.528	0.426	0.038	-35.55	3.44	23.52	-2.86
1.0	0.660	0.748	0.780	0.022	-25.50	-42.78	-49.13	-39.14
2.0	0.596	0.827	0.902	0.037	-10.05	-55.52	-70.28	-45.28
4.0	0.900	0.753	0.756	0.034	-70.41	-41.36	-42.12	-51.29
8.0	0.782	0.970	0.870	0.030	-48.08	-85.04	-65.33	-66.15
12.0	0.980	0.828	0.821	0.039	-85.28	-55.47	-54.08	-64.94
Kontrola	0.550	0.629	0.496	0.050				
IC ₅₀ (mg/mL)					n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

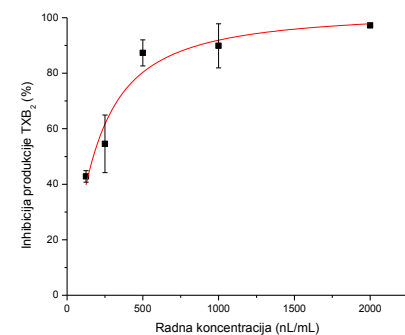
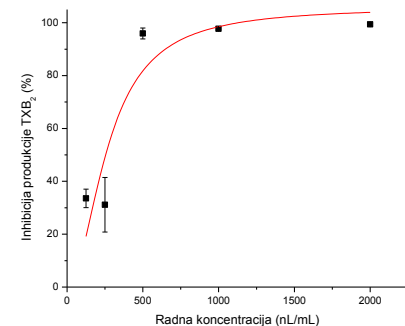
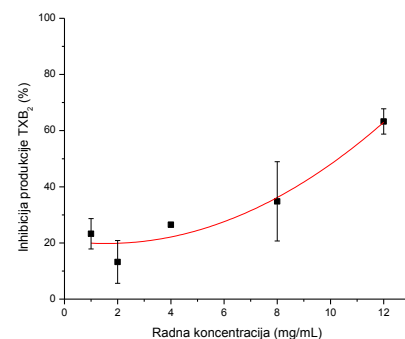
n.d. - IC₅₀ nije dostignuta



Grafik 8.52. Zavisnost inhibicije produkcije TXB₂ (%) – radna koncentracija ekstrakta *J. foetidissima*/iglice; *J. foetidissima*/šišarke; *J. oxycedrus*/šišarke

Tabela 8.58. Potencijal inhibicije produkcije TXB₂
(*J. sabina*/iglice; *J. communis*/iglice; *J. communis*/šišarke – ekstrakti; etarsko ulje)

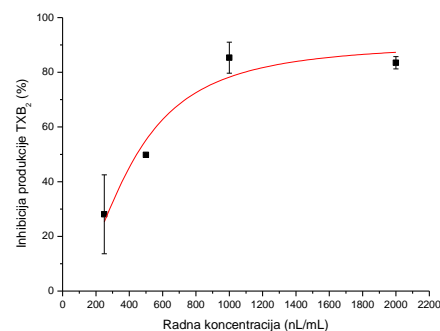
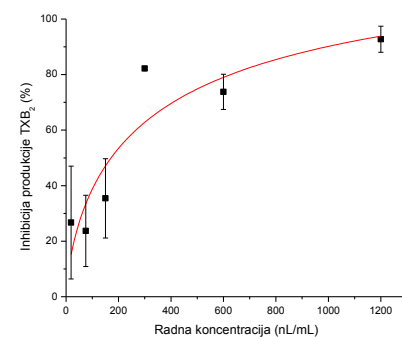
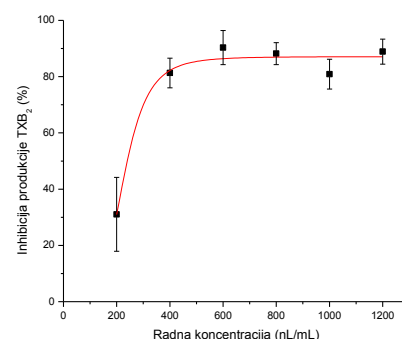
Radna konc. (mg/mL; nL/mL)	TXB ₂ /PGB ₂				Inhibicija produkcije TXB ₂ (%)			
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	Srednja vrednost
<i>J. sabina</i> /iglice								
0.4	0.622	0.664	0.727	0.026	-37.58	-47.41	-61.95	-48.98
1.0	0.389	0.353	0.345	0.030	17.11	25.46	27.27	23.28
2.0	0.475	0.417	0.371	0.018	-5.34	7.85	18.63	13.24
4.0	0.355	0.357	0.361	0.039	27.22	26.62	25.69	26.51
8.0	0.243	0.364	0.316	0.025	49.80	21.71	32.93	34.81
12.0	0.209	0.176	0.210	0.039	60.73	68.47	60.59	63.26
Kontrola	0.450	0.462	0.431	0.015				
IC ₅₀ (mg/mL)					8.64	11.31	10.85	11.08 ±0.32
<i>J. communis</i> /iglice								
32.0	1.144	1.483	1.484	0.075	-2.03	-34.32	-34.47	-23.61
125.0	0.833	0.774	0.766	0.095	29.55	35.18	35.95	33.56
250.0	0.751	0.852	0.968	0.135	41.19	31.62	20.55	31.12
500.0	0.154	0.136	0.179	0.114	96.12	97.88	93.78	95.93
1000.0	0.151	0.146	0.146	0.124	97.44	97.92	97.88	97.74
2000.0	0.150	0.157	0.153	0.147	99.73	99.01	99.44	99.39
Kontrola	0.854	1.164	1.369	0.081				
IC ₅₀ (nL/mL)					235.87	245.97	286.98	256.27 ±27.07
<i>J. communis</i> /šišarke								
32.0	2.039	1.153	1.075	0.050	-123.17	-23.79	-14.98	-53.98
125.0	0.702	0.665	0.688	0.176	40.96	45.06	42.48	42.83
250.0	0.503	0.629	0.683	0.200	66.02	51.91	45.79	54.57
500.0	0.226	0.310	0.269	0.156	92.10	82.69	87.23	87.34
1000.0	0.117	0.206	0.257	0.103	98.43	88.49	82.71	89.87
2000.0	0.160	0.154	0.164	0.134	97.13	97.74	96.72	97.20
Kontrola	0.867	1.143	0.833	0.056				
IC ₅₀ (nL/mL)					158.79	173.59	194.42	175.60 ±17.90



Grafik 8.53. Zavisnost inhibicije produkcije TXB₂ (%) – radna koncentracija ekstrakta ili etarskog ulja
J. sabina/iglice;
J. communis/iglice;
J. communis/šišarke

Tabela 8.59. Potencijal inhibicije produkcije TXB₂
(*J. macrocarpa*/šišarke; *J. excelsa*/iglice; *J. excelsa*/šišarke – etarsko ulje)

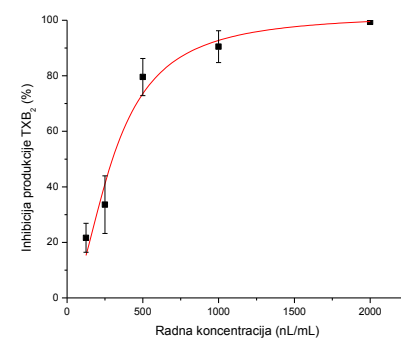
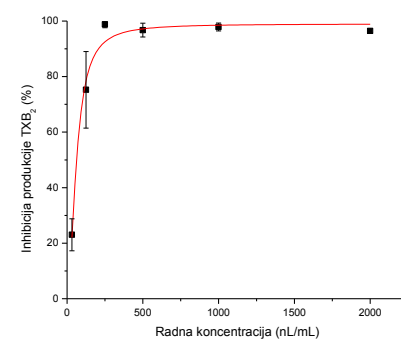
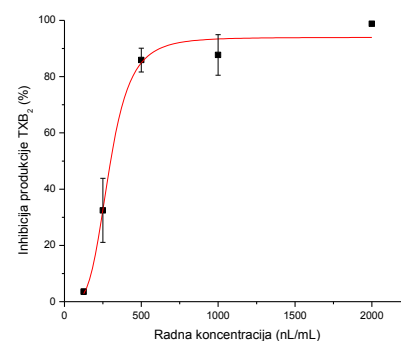
Radna konc. (nL/mL)	TXB ₂ /PGB ₂				Inhibicija produkcije TXB ₂ (%)			Srednja vrednost
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	
<i>J. macrocarpa</i> /šišarke								
200.0	0.924	0.695	0.706	0.097	15.90	39.20	38.02	31.04
400.0	0.324	0.420	0.405	0.199	87.33	77.52	79.09	81.32
600.0	0.356	0.532	0.448	0.395	103.94	86.04	94.62	90.33
800.0	0.277	0.336	0.349	0.204	92.64	86.64	85.25	88.18
1000.0	0.447	0.344	0.380	0.202	75.13	85.59	81.91	80.88
1200.0	0.294	0.357	0.273	0.199	90.31	83.90	92.48	88.90
Kontrola	1.160	1.026	1.042	0.110				
IC ₅₀ (nL/mL)					212.76	230.32	228.67	229.49 ±9.7
<i>J. excelsa</i> /iglice								
19.24	1.186	2.083	1.700	0.132	41.08	-9.14	12.32	26.70
75.0	1.229	1.680	1.530	0.116	37.74	12.52	20.87	23.71
150.0	1.116	1.605	1.486	0.248	51.46	24.08	30.73	35.42
300.0	0.597	0.611	0.593	0.282	82.37	81.57	82.60	82.18
600.0	0.836	0.628	0.654	0.238	66.54	78.14	76.70	73.79
1200.0	0.210	0.357	0.354	0.177	98.15	89.94	90.14	92.75
Kontrola	1.654	1.862	1.847	0.000				
IC ₅₀ (nL/mL)					94.15	192.49	180.83	186.66 ±8.24
<i>J. excelsa</i> /šišarke								
32.0	2.884	1.762	1.903	0.078	-200.45	-80.32	-95.45	-125.41
125.0	1.629	1.964	1.814	0.101	-63.56	-99.42	-83.40	-82.13
250.0	1.069	0.821	0.855	0.243	11.57	38.16	34.55	28.09
500.0	0.750	0.750	0.754	0.283	49.96	49.96	49.57	49.83
1000.0	0.354	0.425	0.321	0.230	86.67	79.16	90.27	85.37
2000.0	0.390	0.432	0.411	0.257	85.76	81.22	83.51	83.49
Kontrola	1.489	2.161	1.587	0.812				
IC ₅₀ (nL/mL)					490.86	409.33	407.81	408.57 ±1.07



Grafik 8.54. Zavisnost inhibicije produkcije TXB₂ (%) – radna koncentracija etarskog ulja
J. macrocarpa/šišarke;
J. excelsa/iglice;
J. excelsa/šišarke

Tabela 8.60. Potencijal inhibicije produkcije TXB₂
(*J. sibirica*/iglice; *J. foetidissima*/iglice; *J. foetidissima*/šišarke – etarsko ulje)

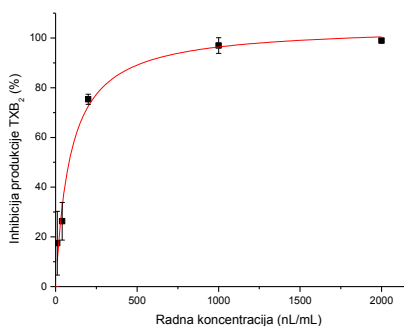
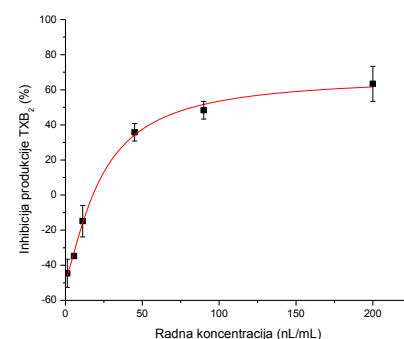
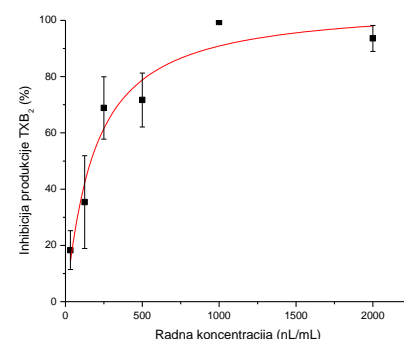
Radna konc. (nL/mL)	TXB ₂ /PGB ₂				Inhibicija produkcije TXB ₂ (%)			
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	Srednja vrednost
<i>J. sibirica</i> /iglice								
32.0	2.686	2.336	2.436	0.000	-50.25	-30.66	-36.26	-39.06
125.0	1.721	1.744	1.710	0.000	3.75	2.49	4.36	3.53
250.0	1.231	1.628	1.506	0.247	45.00	22.78	29.61	32.46
500.0	0.925	0.776	0.874	0.606	82.18	90.48	85.00	85.89
1000.0	0.601	0.821	0.827	0.530	96.03	83.71	83.40	87.71
2000.0	0.446	0.440	0.438	0.419	98.53	98.87	98.94	98.78
Kontrola	1.654	1.862	1.847	0.000				
IC ₅₀ (nL/mL)					490.86	409.33	407.81	292.78±15.98
<i>J. foetidissima</i> /iglice								
32.0	0.749	0.669	0.664	0.054	16.38	26.03	26.65	23.02
125.0	0.458	0.251	0.270	0.120	59.40	84.33	81.97	75.23
250.0	0.175	0.166	0.156	0.156	97.60	98.73	99.98	98.77
500.0	0.135	0.153	0.112	0.106	96.61	94.34	99.28	96.74
1000.0	0.091	0.092	0.112	0.081	98.79	98.59	96.25	97.88
2000.0	0.098	0.108	0.099	0.072	96.93	95.69	96.76	96.46
Kontrola	0.749	1.302	0.708	0.089				
IC ₅₀ (nL/mL)					89.55	52.03	53.37	52.70±0.95
<i>J. foetidissima</i> /šišarke								
32.0	1.304	2.280	2.502	0.127	41.75	-6.55	-17.54	5.89
125.0	2.019	1.602	1.751	0.093	4.69	25.34	17.96	21.65
250.0	1.636	1.256	1.292	0.053	21.65	40.44	38.69	33.59
500.0	0.663	0.530	0.471	0.154	74.80	81.39	84.30	79.55
1000.0	0.284	0.417	0.515	0.213	96.48	89.94	85.06	90.49
2000.0	0.156	0.168	0.179	0.155	99.99	99.36	98.83	99.39
Kontrola	2.092	2.148	2.274	0.150				
IC ₅₀ (nL/mL)					323.77	306.01	279.55	303.11±22.25



Grafik 8.55. Zavisnost inhibicije produkcije TXB₂ (%) – radna koncentracija etarskog ulja
J. sibirica/iglice;
J. foetidissima/iglice;
J. foetidissima/šišarke

Tabela 8.61. Potencijal inhibicije produkcije TXB₂
(*J. oxycedrus*/iglice; *J. oxycedrus*/šišarke; *J. sabina*/iglice – etarsko ulje)

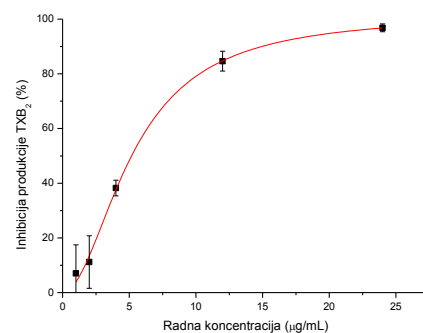
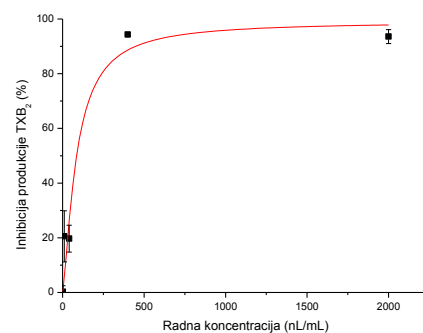
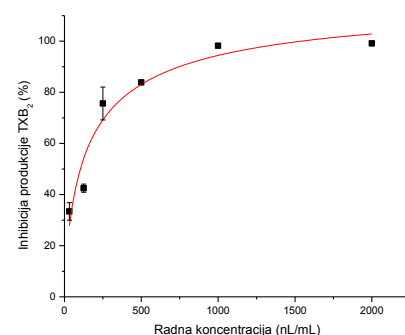
Radna konc. (nL/mL)	TXB ₂ /PGB ₂				Inhibicija produkcije TXB ₂ (%)			Srednja vrednost
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	
<i>J. oxycedrus</i> /iglice								
32.0	0.761	0.720	0.647	0.031	12.14	17.03	25.80	18.32
125.0	0.749	0.512	0.751	0.133	25.97	54.41	25.72	35.37
250.0	0.270	0.425	0.433	0.117	81.67	62.94	61.97	68.86
500.0	0.272	0.394	0.421	0.127	82.60	67.84	64.61	71.68
1000.0	0.203	0.199	0.203	0.197	99.24	99.78	99.23	99.42
2000.0	0.249	0.175	0.195	0.153	88.43	97.34	95.00	93.59
Kontrola	0.749	1.302	0.708	0.089				
IC ₅₀ (nL/mL)					161.57	141.80	208.10	151.69 ±13.98
<i>J. oxycedrus</i> /šišarke								
1.2	2.459	2.432	2.233	0.139	-50.05	-48.28	-35.42	-44.58
5.6	1.417	2.257	2.233	0.162	18.80	-35.55	-33.96	-34.75
11.2	1.799	2.076	1.915	0.154	-6.39	-24.28	-13.90	-14.86
45.0	1.088	1.205	1.060	0.124	37.68	30.09	39.46	35.74
90.0	1.131	0.985	1.007	0.243	42.55	51.98	50.55	48.36
200.0	0.693	0.913	0.990	0.300	74.55	60.37	55.34	63.42
Kontrola	1.613	1.762	1.492	0.076				
IC ₅₀ (nL/mL)					91.43	87.86	80.32	86.54 ±5.67
<i>J. sabina</i> /iglice								
2.0	2.047	1.529	1.465	0.116	-24.94	8.56	12.75	-1.21
10.0	1.648	1.370	1.265	0.152	3.17	21.20	28.01	17.46
40.0	1.404	1.236	1.178	0.133	17.79	28.66	32.40	26.28
200.0	0.895	0.491	0.536	0.133	50.66	76.79	73.93	75.36
1000.0	0.201	0.212	0.290	0.188	99.17	98.41	93.37	96.98
2000.0	0.254	0.264	0.238	0.235	98.82	98.14	99.85	98.94
Kontrola	1.613	1.762	1.492	0.076				
IC ₅₀ (nL/mL)					121.94	72.54	67.76	70.15 ±3.38



Grafik 8.56. Zavisnost inhibicije produkcije TXB₂ (%) – radna koncentracija etarskog ulja
J. oxycedrus/iglice;
J. oxycedrus/šišarke;
J. sabina/iglice

Tabela 8.62. Potencijal inhibicije produkcije TXB₂
(*J. phoenicea*/iglice; *J. phoenicea*/šišarke; aspirin – etarsko ulje; standard)

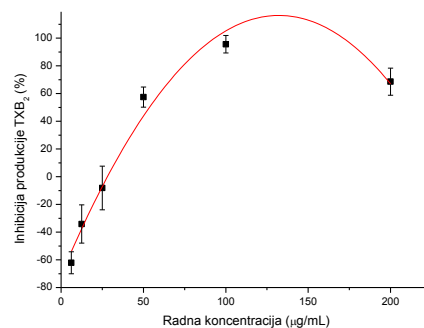
Radna konc. (nL/mL; µg/mL)	TXB ₂ /PGB ₂				Inhibicija produkcije TXB ₂ (%)			
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	Srednja vrednost
<i>J. phoenicea</i> /iglice								
32.0	0.754	0.693	0.720	0.129	29.87	36.70	33.71	33.43
125.0	0.635	0.618	0.646	0.121	42.28	44.16	41.03	42.49
250.0	0.350	0.456	0.441	0.199	83.00	71.12	72.79	75.64
500.0	0.271	0.277	0.269	0.128	84.01	83.38	84.18	83.86
1000.0	0.190	0.183	0.188	0.171	97.88	98.73	98.07	98.23
2000.0	0.150	0.144	0.151	0.140	98.93	99.58	98.78	99.10
Kontrola	0.867	1.143	0.833	0.056				
IC ₅₀ (nL/mL)					102.45	98.48	108.55	103.16 ±5.07
<i>J. phoenicea</i> /šišarke								
0.2	1.787	2.348	2.318	0.134	11.50	-18.53	-16.91	-7.98
2.0	1.968	1.932	1.990	0.099	-0.05	1.85	-1.25	0.30
10.0	1.435	1.690	1.769	0.147	31.06	17.40	13.13	20.53
40.0	1.733	1.798	1.617	0.216	18.78	15.29	24.98	19.69
400.0	0.595	0.583	0.569	0.476	93.64	94.27	95.00	94.30
2000.0	0.638	0.592	0.687	0.519	93.60	96.11	91.02	93.58
Kontrola	1.943	2.355	1.689	0.128				
IC ₅₀ (nL/mL)					80.76	94.89	73.10	87.82 ±9.99
aspirin								
0.4	0.217	0.221	0.202	0.217	100.01	99.77	100.78	100.19
1.0	2.008	1.667	1.732	0.133	-0.33	17.92	14.42	7.04
2.0	1.587	1.946	1.767	0.108	20.80	1.57	11.18	11.18
4.0	1.242	1.318	1.027	0.127	40.28	36.21	51.78	38.25
12.0	0.486	0.420	0.351	0.132	81.03	84.60	88.25	84.63
24.0	0.232	0.216	0.180	0.150	95.61	96.47	98.39	96.82
Kontrola	1.943	2.355	1.689	0.128				
IC ₅₀ (µg/mL)					5.01	5.01	4.91	4.98 ±0.06



Grafik 8.57. Zavisnost inhibicije produkcije TXB₂ (%) – radna koncentracija etarskog ulja ili standarda
J. phoenicea/iglice;
J. phoenicea/šišarke;
aspirin

Tabela 8.63. Potencijal inhibicije produkcije TXB₂ (kvercetin - standard)

Radna konc. (µg/mL)	TXB ₂ /PGB ₂				Inhibicija produkcije TXB ₂ (%)			
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	Srednja vrednost
kvercetin								
6.24	0.550	0.582	0.601	0.052	-53.57	-63.57	-69.23	-62.12
12.48	0.521	0.457	0.543	0.072	-38.37	-18.77	-45.27	-34.14
25.0	0.436	0.373	0.335	0.031	-25.06	-5.69	6.15	-8.20
50.0	0.173	0.220	0.195	0.058	64.51	50.01	57.77	57.43
100.0	0.114	0.077	0.081	0.076	88.28	99.79	98.65	95.57
200.0	0.097	0.158	0.140	0.030	79.41	60.48	65.86	68.59
Kontrola	0.550	0.557	0.489	0.208				
IC ₅₀ (µg/mL)					56.52	52.62	51.94	53.69 ±2.47



Grafik 8.58. Zavisnost inhibicije produkcije TXB₂ (%) – radna koncentracija standarda kvercetin

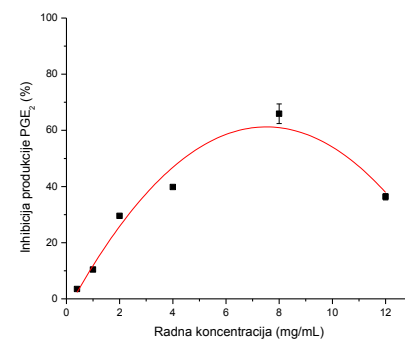
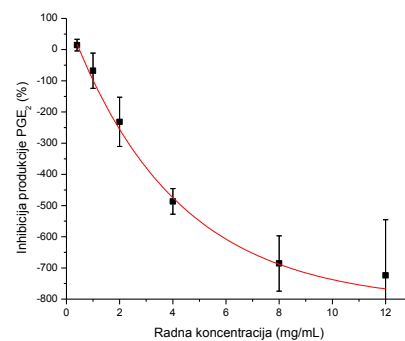
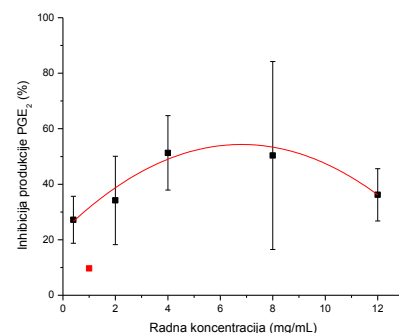
8.3.3. Potencijal inhibicije produkcije PGE₂

Tabela 8.64. Potencijal inhibicije produkcije PGE₂

(*J. communis*/iglice; *J. macrocarpa*/šišarke; *J. sibirica*/iglice - ekstrakti)

Radna konc. (mg/mL)	PGE ₂ /PGB ₂				Inhibicija produkcije PGE ₂ (%)			Srednja vrednost
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	
<i>J. communis</i> /iglice								
0.4	0.047	0.082	0.069	0.000	54.87	21.21	33.17	27.19
1.0	0.094	0.106	0.082	0.000	9.65	-2.29	21.36	9.65
2.0	0.060	0.088	0.058	0.000	42.31	15.83	44.39	34.18
4.0	0.041	0.067	0.044	0.000	60.13	35.90	57.89	51.31
8.0	0.101	0.077	0.027	0.000	2.99	26.43	74.29	50.36
12.0	0.091	0.110	0.101	0.034	45.64	26.84	36.09	36.19
Kontrola	0.071	0.137	0.053	0.000				
IC ₅₀ (mg/mL)					2.72	n.d.	2.81	2.76 ±0.06
<i>J. macrocarpa</i> /šišarke								
0.4	0.102	0.089	0.135	0.000	19.43	30.23	-6.41	14.42
1.0	0.130	0.259	0.250	0.000	-2.70	-103.88	-96.85	-67.81
2.0	0.041	0.350	0.492	0.000	67.41	-175.93	-287.25	-231.59
4.0	0.805	0.712	0.719	0.000	-534.01	-460.27	-465.80	-486.69
8.0	0.949	0.918	1.127	0.000	-647.17	-622.51	-787.07	-685.58
12.0	1.238	1.105	0.796	0.000	-874.51	-770.00	-526.59	-723.70
Kontrola	0.139	0.129	0.112	0.000				
IC ₅₀ (mg/mL)					n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>J. sibirica</i> /iglice								
0.4	0.119	0.151	0.142	0.000	18.80	-2.55	3.52	3.52
1.0	0.147	0.216	0.132	0.000	0.00	-47.09	10.45	10.45
2.0	0.162	0.104	0.067	0.000	-9.89	29.57	54.65	29.57
4.0	0.139	0.125	0.157	0.037	30.53	39.84	18.22	39.84
8.0	0.149	0.114	0.122	0.068	45.12	68.39	63.46	65.92
12.0	0.169	0.180	0.182	0.087	44.38	37.16	35.56	36.36
Kontrola	0.116	0.159	0.166	0.000				
IC ₅₀ (mg/mL)					n.d.	4.26	4.07	4.16 ±0.13

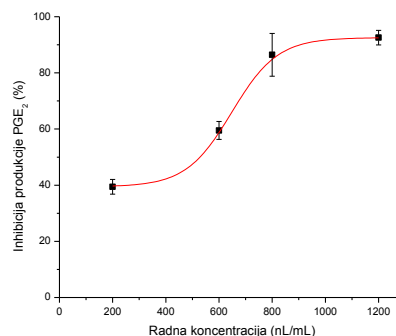
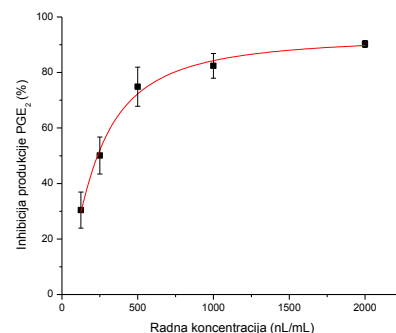
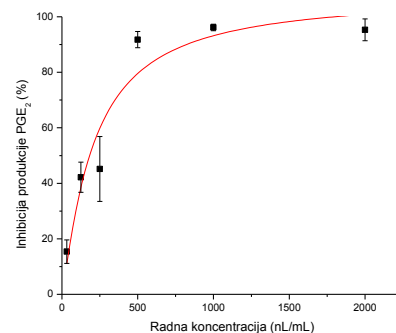
n.d. - IC₅₀ nije dostignuta



Grafik 8.59. Zavisnost inhibicije produkcije PGE₂ (%) – radna koncentracija ekstrakta *J. communis*/iglice; *J. macrocarpa*/šišarke; *J. sibirica*/iglice

Tabela 8.65. Potencijal inhibicije produkcije PGE₂
(*J. communis*/iglice; *J. communis*/šišarke; *J. macrocarpa*/šišarke – etarsko ulje)

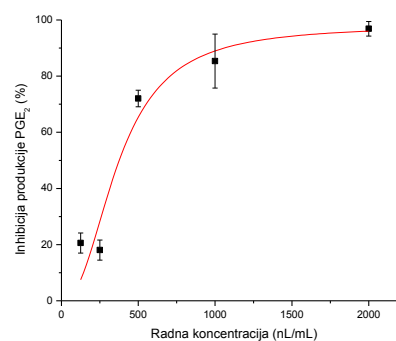
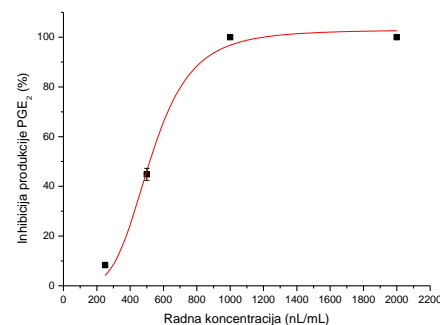
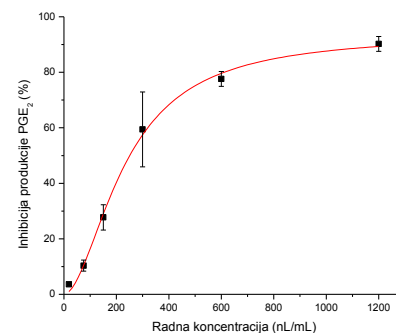
Radna konc. (nL/mL)	PGE ₂ /PGB ₂				Inhibicija produkcije PGE ₂ (%)			Srednja vrednost
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	
<i>J. communis</i> /iglice								
32.0	0.283	0.281	0.258	0.000	12.56	13.35	20.22	15.38
125.0	0.233	0.235	0.203	0.036	39.41	38.70	48.45	42.19
250.0	0.174	0.234	0.244	0.040	58.57	39.97	36.96	45.17
500.0	0.069	0.078	0.088	0.052	94.64	91.86	88.84	91.78
1000.0	0.091	0.099	0.095	0.083	97.33	95.01	96.14	96.16
2000.0	0.055	0.059	0.079	0.049	98.13	97.01	90.83	95.33
Kontrola	0.287	0.299	0.386	0.000				
IC ₅₀ (nL/mL)					166.80	208.34	176.64	171.72 ±6.96
<i>J. communis</i> /šišarke								
32.0	0.423	0.353	0.290	0.021	-55.66	-28.50	-4.05	-29.41
125.0	0.254	0.248	0.223	0.062	25.53	27.94	37.79	30.42
250.0	0.225	0.192	0.214	0.082	44.35	57.40	48.54	50.10
500.0	0.104	0.134	0.102	0.048	78.57	66.77	79.32	74.89
1000.0	0.084	0.087	0.105	0.046	85.50	84.40	77.27	82.39
2000.0	0.078	0.084	0.084	0.057	91.73	89.51	89.58	90.27
Kontrola	0.284	0.308	0.205	0.008				
IC ₅₀ (nL/mL)					256.42	233.44	211.06	233.64 ±22.68
<i>J. macrocarpa</i> /šišarke								
200.0	0.112	0.110	0.103	0.000	37.37	38.54	42.36	39.42
400.0	0.051	0.115	0.084	0.076	114.27	78.33	95.46	96.02
600.0	0.068	0.070	0.079	0.000	61.74	60.89	55.87	59.50
800.0	0.062	0.090	0.074	0.051	93.76	78.53	87.02	86.44
1000.0	0.101	0.113	0.081	0.038	64.83	57.76	75.57	66.05
1200.0	0.080	0.071	0.079	0.063	90.73	95.52	91.40	92.55
Kontrola	0.186	0.171	0.143	0.000				
IC ₅₀ (nL/mL)					513.37	550.95	525.37	529.90 ±19.19



Grafik 8.60. Zavisnost inhibicije produkcije PGE₂ (%) – radna koncentracija etarskog ulja
J. communis/iglice;
J. communis/šišarke;
J. macrocarpa/šišarke

Tabela 8.66. Potencijal inhibicije produkcije PGE₂
(*J. excelsa*/iglice; *J. excelsa*/šišarke; *J. sibirica*/iglice – etarsko ulje)

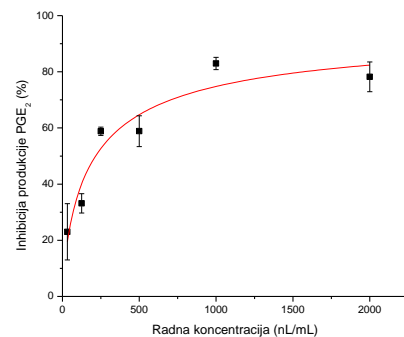
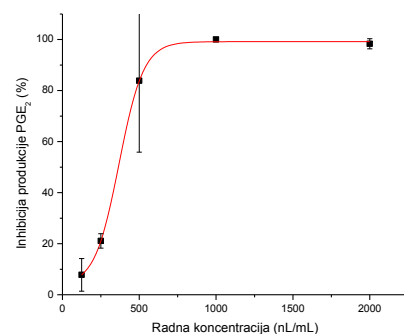
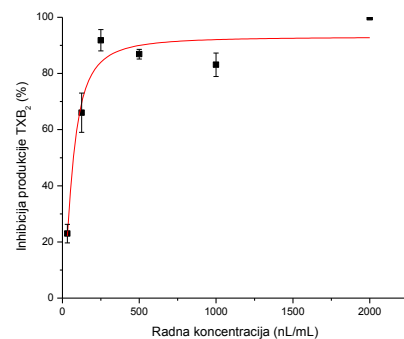
Radna konc. (nL/mL)	PGE ₂ /PGB ₂				Inhibicija produkcije PGE ₂ (%)			Srednja vrednost
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	
<i>J. excelsa</i> /iglice								
19.24	0.163	0.198	0.198	0.000	3.61	-17.11	-16.94	3.61
75.0	0.155	0.149	0.150	0.000	8.07	11.82	11.11	10.33
150.0	0.129	0.123	0.114	0.000	23.52	27.11	32.54	27.72
300.0	0.132	0.090	0.095	0.037	43.96	68.75	65.54	59.41
600.0	0.067	0.074	0.075	0.034	80.66	76.43	75.75	77.61
1200.0	0.045	0.049	0.040	0.028	90.26	87.53	92.88	90.22
Kontrola	0.154	0.185	0.168	0.000				
IC ₅₀ (nL/mL)					312.56	217.81	223.75	220.78 ±4.20
<i>J. excelsa</i> /šišarke								
32.0	0.248	0.164	0.158	0.000	-90.82	-25.81	-21.66	-46.10
125.0	0.191	0.169	0.186	0.000	-47.24	-29.75	-42.92	-39.97
250.0	0.121	0.119	0.118	0.000	7.28	8.46	9.36	8.37
500.0	0.075	0.069	0.071	0.000	42.20	46.92	45.38	44.83
1000.0	0.000	0.000	0.000	0.000	100.0	100.0	100.0	100.0
2000.0	0.000	0.000	0.000	0.000	100.0	100.0	100.0	100.0
Kontrola	0.180	0.200	0.130	0.090				
IC ₅₀ (nL/mL)					529.41	508.21	514.28	517.30 ±10.92
<i>J. sibirica</i> /iglice								
32.0	0.191	0.190	0.236	0.000	-12.83	-12.22	-39.86	-21.64
125.0	0.140	0.135	0.128	0.000	17.43	20.08	24.22	20.58
250.0	0.138	0.132	0.145	0.000	18.07	21.63	14.48	18.06
500.0	0.128	0.121	0.118	0.075	68.75	73.02	74.34	72.04
1000.0	0.122	0.123	0.150	0.107	91.12	90.72	74.27	85.37
2000.0	0.081	0.088	0.089	0.081	99.83	95.70	95.05	96.86
Kontrola	0.154	0.185	0.168	0.000				
IC ₅₀ (nL/mL)					388.64	357.50	388.71	378.28 ±18.00



Grafik 8.61. Zavisnost inhibicije produkcije PGE₂ (%) – radna koncentracija etarskog ulja
J. excelsa/iglice;
J. excelsa/šišarke;
J. sibirica/iglice

Tabela 8.67. Potencijal inhibicije produkcije PGE₂
(*J. foetidissima*/iglice; *J. foetidissima*/šišarke; *J. oxycedrus*/iglice – etarsko ulje)

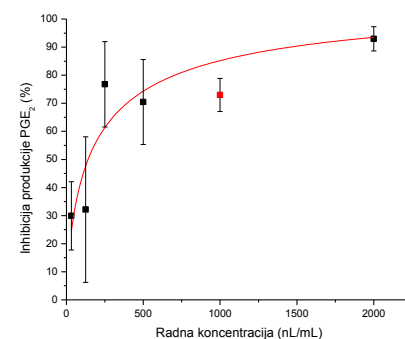
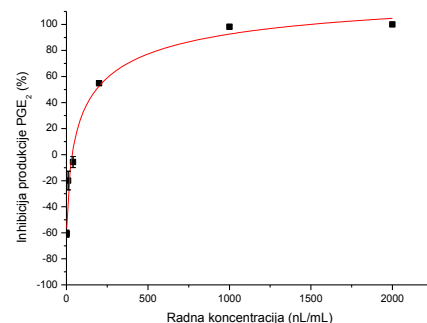
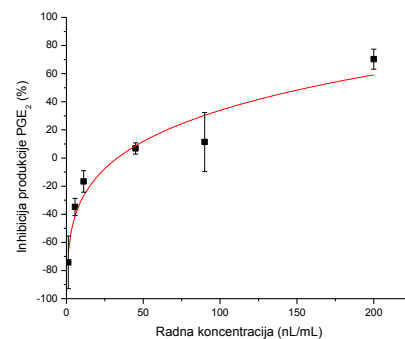
Radna konc. (nL/mL)	PGE ₂ /PGB ₂				Inhibicija produkcije PGE ₂ (%)			Srednja vrednost
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	
<i>J. foetidissima</i> /iglice								
32.0	0.198	0.214	0.194	0.000	25.28	19.21	24.41	22.97
125.0	0.103	0.099	0.066	0.000	61.30	62.74	74.09	66.04
250.0	0.045	0.042	0.060	0.028	93.56	94.45	87.46	91.82
500.0	0.058	0.067	0.063	0.028	88.78	85.44	86.42	86.88
1000.0	0.058	0.037	0.051	0.000	78.03	86.07	80.16	83.11
2000.0	0.000	0.000	0.000	0.000	100.0	100.0	100.0	100.0
Kontrola	0.232	0.367	0.195	0.000				
IC ₅₀ (nL/mL)					75.28	79.06	61.19	71.84 ±9.42
<i>J. foetidissima</i> /šišarke								
32.0	0.184	0.256	0.284	0.000	-5.60	-31.96	-46.31	-27.96
125.0	0.172	0.178	0.167	0.000	1.15	8.34	13.88	7.79
250.0	0.133	0.159	0.153	0.000	23.80	18.16	21.24	21.06
500.0	0.084	0.000	0.000	0.000	51.54	100.0	100.0	83.85
1000.0	0.000	0.000	0.000	0.000	100.0	100.0	100.0	100.0
2000.0	0.046	0.047	0.053	0.045	99.60	99.31	96.03	98.32
Kontrola	0.230	0.168	0.185	0.000				
IC ₅₀ (nL/mL)					471.57	287.38	317.38	302.38 ±20.95
<i>J. oxycedrus</i> /iglice								
32.0	0.177	0.230	0.205	0.000	33.19	13.14	22.67	23.00
125.0	0.183	0.181	0.167	0.000	30.78	31.63	37.11	33.17
250.0	0.155	0.149	0.156	0.044	58.26	60.48	57.70	58.81
500.0	0.126	0.130	0.153	0.027	62.79	61.21	52.57	58.86
1000.0	0.095	0.106	0.102	0.056	85.36	81.06	82.47	82.96
2000.0	0.092	0.067	0.089	0.025	74.64	84.30	75.70	78.21
Kontrola	0.232	0.367	0.195	0.000				
IC ₅₀ (nL/mL)					239.01	222.51	225.59	229.04 ±8.77



Grafik 8.62. Zavisnost inhibicije produkcije PGE₂ (%) – radna koncentracija etarskog ulja *J. foetidissima*/iglice; *J. foetidissima*/šišarke; *J. oxycedrus*/iglice

Tabela 8.68. Potencijal inhibicije produkcije PGE₂
(*J. oxycedrus*/šišarke; *J. sabina*/iglice; *J. phoenicea*/iglice – etarsko ulje)

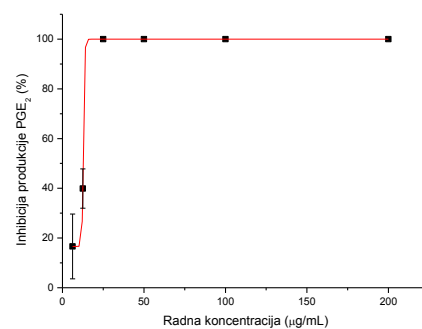
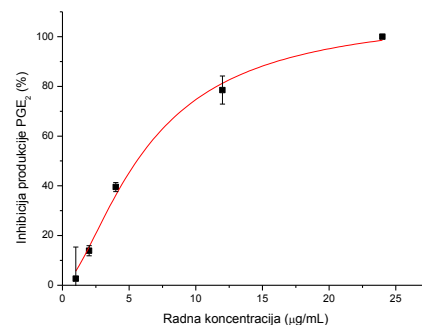
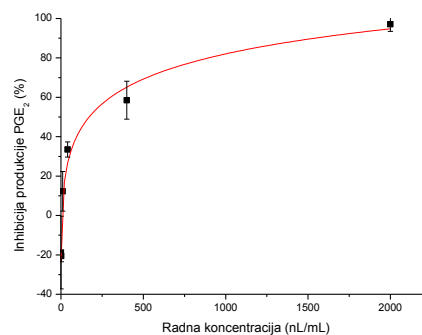
Radna konc. (nL/mL)	PGE ₂ /PGB ₂				Inhibicija produkcije PGE ₂ (%)			Srednja vrednost
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	
<i>J. oxycedrus</i> /šišarke								
1.2	0.307	0.282	0.247	0.000	-91.61	-76.54	-54.38	-74.17
5.6	0.227	0.208	0.212	0.000	-41.62	-29.87	-32.74	-34.74
11.2	0.195	0.178	0.115	0.000	-22.08	-11.27	27.97	-16.68
45.0	0.144	0.156	0.147	0.000	9.96	2.34	8.03	6.78
90.0	0.104	0.170	0.151	0.000	34.77	-6.09	5.44	11.37
200.0	0.151	0.135	0.157	0.100	68.38	78.17	64.35	70.30
Kontrola	0.165	0.145	0.169	0.000				
IC ₅₀ (nL/mL)					31.13	157.82	169.59	163.71 ±8.32
<i>J. sabina</i> /iglice								
2.0	0.262	0.254	0.255	0.000	-63.64	-58.76	-59.65	-60.68
10.0	0.205	0.188	0.183	0.000	-28.01	-17.30	-14.46	-19.92
40.0	0.176	0.169	0.162	0.000	-9.86	-5.89	-1.35	-5.70
200.0	0.070	0.072	0.075	0.000	56.43	54.90	53.13	54.82
1000.0	0.049	0.045	0.050	0.045	97.65	99.98	97.09	98.24
2000.0	0.000	0.000	0.000	0.000	100.0	100.0	100.0	100.0
Kontrola	0.165	0.145	0.169	0.000				
IC ₅₀ (nL/mL)					177.74	180.60	188.51	182.28 ±5.58
<i>J. phoenicea</i> /iglice								
32.0	0.238	0.199	0.176	0.024	16.86	32.02	40.88	29.92
125.0	0.264	0.171	0.134	0.015	3.36	39.48	53.62	32.15
250.0	0.111	0.100	0.173	0.068	83.31	87.62	59.39	76.77
500.0	0.133	0.148	0.074	0.042	64.84	58.96	87.61	70.47
1000.0	0.089	0.115	0.115	0.037	79.74	69.67	69.48	72.96
2000.0	0.085	0.070	0.092	0.064	92.06	97.64	89.19	92.96
Kontrola	0.284	0.308	0.205	0.008				
IC ₅₀ (nL/mL)					157.55	130.76	125.69	144.16 ±18.94



Grafik 8.63. Zavisnost inhibicije produkcije PGE₂ (%) – radna koncentracija etarskog ulja
J. oxycedrus/šišarke;
J. sabina/iglice;
J. phoenicea/iglice

Tabela 8.69. Potencijal inhibicije produkcije PGE₂ (*J. phoenicea*/šišarke; aspirin; kvercetin – etarsko ulje; standard)

Radna konc. (nL/mL; µg/mL)	PGE ₂ /PGB ₂				Inhibicija produkcije PGE ₂ (%)			
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	Srednja vrednost
<i>J. phoenicea</i> /šišarke								
0.2	0.211	0.281	0.278	0.000	2.48	-30.05	-28.89	-18.82
2.0	0.237	0.256	0.265	0.000	-9.73	-18.60	-22.64	-20.62
10.0	0.202	0.202	0.164	0.000	6.32	6.60	23.88	12.27
40.0	0.134	0.150	0.138	0.000	38.19	30.75	36.24	33.49
400.0	0.075	0.104	0.156	0.000	65.33	51.72	27.81	58.53
2000.0	0.141	0.155	0.141	0.139	99.28	92.95	99.16	97.13
Kontrola	0.193	0.257	0.200	0.000				
IC ₅₀ (nL/mL)					215.82	236.30	234.69	228.94 ±11.39
aspirin								
0.4	0.000	0.000	0.000	0.000	100.0	100.0	100.0	100.0
1.0	0.230	0.191	0.232	0.000	-6.29	11.64	-7.47	2.67
2.0	0.190	0.182	0.186	0.000	11.87	15.93	13.89	13.90
4.0	0.134	0.127	0.131	0.000	37.74	41.38	39.45	39.52
12.0	0.060	0.036	0.043	0.000	72.32	83.35	79.91	78.53
24.0	0.000	0.000	0.000	0.000	100.0	100.0	100.0	100.0
Kontrola	0.193	0.257	0.200	0.000				
IC ₅₀ (µg/mL)					6.14	5.09	5.50	5.58 ±0.53
kvercetin								
6.24	0.096	0.132	0.114	0.000	29.61	3.55	16.74	16.63
12.48	0.089	0.088	0.070	0.000	34.83	35.83	48.98	39.88
25.0	0.000	0.000	0.000	0.000	100.0	100.0	100.0	100.0
50.0	0.000	0.000	0.000	0.000	100.0	100.0	100.0	100.0
100.0	0.000	0.000	0.000	0.000	100.0	100.0	100.0	100.0
200.0	0.000	0.000	0.000	0.000	100.0	100.0	100.0	100.0
Kontrola	0.117	0.178	0.116	0.000				
IC ₅₀ (µg/mL)					13.03	12.70	12.51	12.75 ±0.26



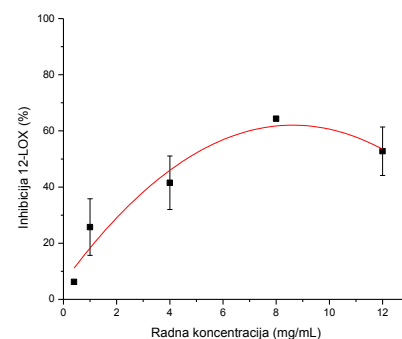
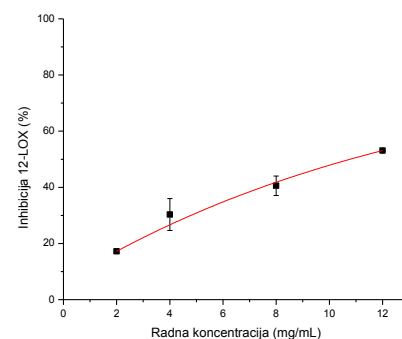
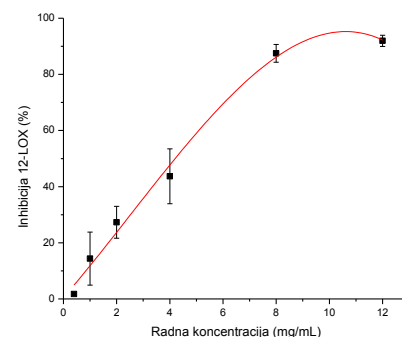
Grafik 8.64. Zavisnost inhibicije produkcije PGE₂ (%) – radna koncentracija etarskog ulja ili standarda *J. phoenicea*/šišarke; aspirin; kvercetin

8.3.4. Potencijal inhibicije produkcije 12-HETE

Tabela 8.70. Potencijal inhibicije produkcije 12-HETE

(*J. communis*/iglice; *J. communis*/šišarke; *J. macrocarpa*/šišarke - ekstrakti)

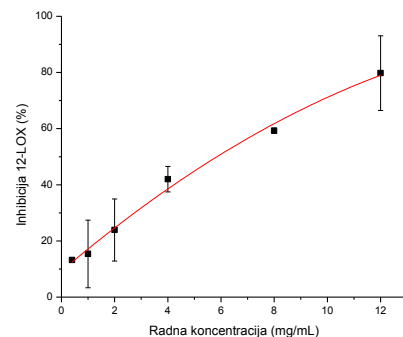
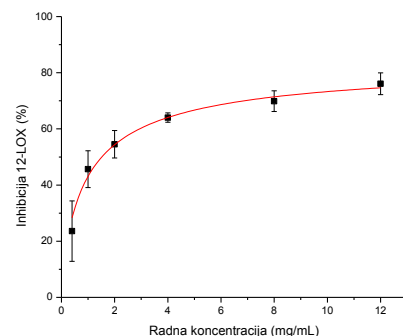
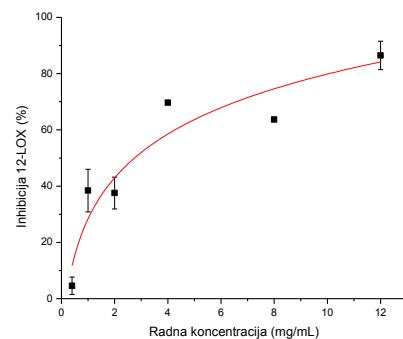
Radna konc. (mg/mL)	12-HETE/PGB ₂				Inhibicija produkcije 12-HETE (%)			Srednja vrednost
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	
<i>J. communis</i> /iglice								
0.4	5.913	2.464	2.753	0.260	1.77	61.72	56.69	1.77
1.0	5.064	6.817	5.833	0.519	21.02	-9.44	7.66	14.34
2.0	4.847	4.732	4.231	0.420	23.09	25.08	33.78	27.32
4.0	2.980	3.762	4.069	0.364	54.53	40.95	35.61	43.70
8.0	1.309	0.955	1.048	0.385	83.94	90.09	88.47	87.50
12.0	0.508	0.724	0.689	0.177	94.25	90.49	91.09	91.94
Kontrola	6.062	6.912	5.427	0.378				
IC ₅₀ (mg/mL)					3.66	4.06	4.22	3.98 ±0.29
<i>J. communis</i> /šišarke								
0.4	7.123	7.112	6.858	0.224	-19.89	-19.70	-15.27	-18.29
1.0	6.723	6.119	7.432	0.337	-10.98	-0.47	-23.29	-11.58
2.0	5.257	2.883	3.025	0.492	17.21	58.45	55.98	17.21
4.0	4.133	4.479	4.785	0.456	36.11	30.09	24.77	30.32
8.0	3.971	3.577	3.717	0.334	36.80	43.65	41.22	40.56
12.0	3.011	2.871	2.880	0.183	52.86	53.29	53.14	53.10
Kontrola	6.062	6.912	5.427	0.378				
IC ₅₀ (mg/mL)					10.49	10.92	11.04	11.04 ±0.62
<i>J. macrocarpa</i> /šišarke								
0.4	3.147	2.063	2.851	0.537	-5.75	38.17	6.24	6.24
1.0	2.620	1.920	2.271	0.263	4.49	32.85	18.63	25.74
2.0	0.170	2.410	2.418	0.274	104.21	13.42	13.11	13.27
4.0	1.792	1.859	1.527	0.250	37.51	34.81	48.26	41.53
8.0	2.285	1.505	1.937	0.625	32.75	64.32	46.85	64.32
12.0	2.673	2.175	1.873	0.858	26.46	46.65	58.87	52.76
Kontrola	3.028	1.985	2.983	0.198				
IC ₅₀ (mg/mL)					-	5.20	5.40	5.30 ±0.14



Grafik 8.65. Zavisnost inhibicije produkcije 12-HETE (%) – radna koncentracija ekstrakta *J. communis*/iglice; *J. communis*/šišarke; *J. macrocarpa*/šišarke

Tabela 8.71. Potencijal inhibicije produkcije 12-HETE
(*J. excelsa*/iglice; *J. excelsa*/šišarke; *J. sibirica*/iglice - ekstrakti)

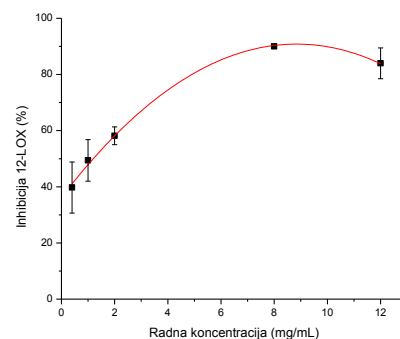
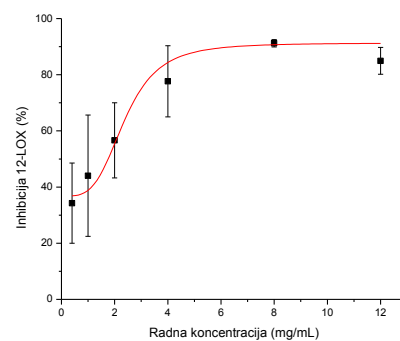
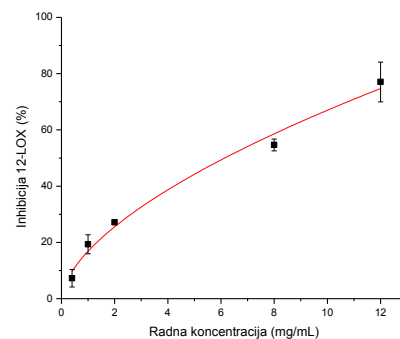
Radna konc. (mg/mL)	12-HETE/PGB ₂				Inhibicija produkcije 12-HETE (%)			
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	Srednja vrednost
<i>J. excelsa</i> /iglice								
0.4	2.149	2.088	2.228	0.000	4.87	7.57	1.36	4.60
1.0	1.674	1.439	1.772	0.238	36.43	46.81	32.09	38.44
2.0	1.394	1.582	1.638	0.128	43.93	35.62	33.15	37.57
4.0	0.845	1.676	0.916	0.232	72.83	36.07	69.70	69.70
8.0	0.821	0.900	1.068	0.000	63.65	60.16	52.74	63.65
12.0	0.371	0.600	0.484	0.180	91.52	81.40	86.52	86.48
Kontrola	1.968	2.599	2.924	0.237				
IC ₅₀ (mg/mL)					2.98	2.55	2.50	2.68 ±0.26
<i>J. excelsa</i> /šišarke								
0.4	1.730	2.075	1.605	0.077	26.83	11.56	32.37	23.59
1.0	1.581	1.315	1.338	0.183	38.14	49.93	48.90	45.66
2.0	0.995	1.216	1.094	0.074	59.25	49.47	54.85	54.52
4.0	0.938	0.871	0.935	0.102	63.00	65.94	63.14	64.03
8.0	0.653	0.805	0.670	0.029	72.35	65.62	71.60	69.86
12.0	0.579	0.753	0.647	0.119	79.65	71.95	76.63	76.08
Kontrola	1.968	2.599	2.924	0.237				
IC ₅₀ (mg/mL)					1.59	1.31	1.32	1.41 ±0.16
<i>J. sibirica</i> /iglice								
0.4	6.236	5.382	6.216	0.347	-1.48	13.23	-1.14	13.23
1.0	4.644	5.938	5.749	0.534	29.18	6.88	10.13	15.40
2.0	4.015	5.280	4.844	0.297	35.93	14.13	21.65	23.90
4.0	2.967	3.471	3.841	0.290	53.87	45.19	38.81	42.00
8.0	2.743	2.635	2.659	0.313	58.14	60.00	59.57	59.24
12.0	2.402	1.019	1.116	0.339	64.45	88.28	86.61	79.78
Kontrola	6.382	6.228	6.519	0.573				
IC ₅₀ (mg/mL)					5.10	5.86	6.04	5.67 ±0.50



Grafik 8.66. Zavisnost inhibicije produkcije 12-HETE (%) – radna koncentracija ekstrakta *J. excelsa*/iglice; *J. excelsa*/šišarke; *J. sibirica*/iglice

Tabela 8.72. Potencijal inhibicije produkcije 12-HETE (*J. sibirica*/šišarke; *J. foetidissima*/iglice; *J. foetidissima*/šišarke - ekstrakti)

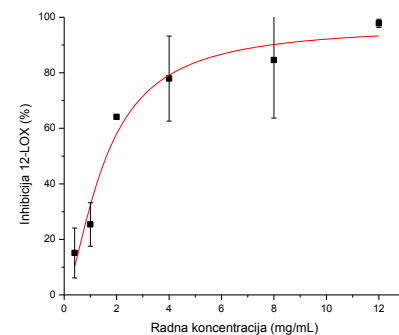
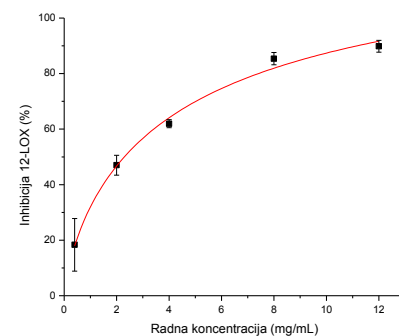
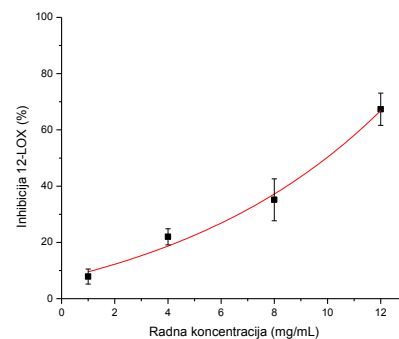
Radna konc. (mg/mL)	12-HETE/PGB ₂				Inhibicija produkcije 12-HETE (%)			Srednja vrednost
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	
<i>J. sibirica</i> /šišarke								
0.4	5.746	6.090	5.827	0.505	9.69	3.77	8.30	7.25
1.0	4.791	5.176	4.909	0.278	22.23	15.59	20.20	19.34
2.0	4.612	4.650	4.556	0.377	27.03	26.37	28.00	27.13
4.0	4.435	2.703	2.732	0.519	32.52	62.36	61.85	52.24
8.0	2.885	2.888	3.098	0.325	55.88	55.84	52.21	54.64
12.0	2.094	1.353	1.415	0.288	68.87	81.66	80.58	77.04
Kontrola	6.382	6.228	6.519	0.573				
IC ₅₀ (mg/mL)					6.26	6.16	5.97	6.13 ±0.15
<i>J. foetidissima</i> /iglice								
0.4	1.523	1.880	2.257	0.198	48.40	34.54	19.83	34.25
1.0	1.251	1.396	2.036	0.206	59.31	53.67	28.76	44.04
2.0	1.287	1.773	1.656	0.416	66.11	47.18	51.71	56.64
4.0	1.156	0.566	0.622	0.208	63.09	86.04	83.86	77.66
8.0	0.538	0.472	0.505	0.279	89.93	92.51	91.19	91.21
12.0	0.514	0.757	0.605	0.238	89.26	79.81	85.72	84.93
Kontrola	2.142	3.324	2.954	0.237				
IC ₅₀ (mg/mL)					0.48	1.64	1.63	1.63 ±0.01
<i>J. foetidissima</i> /šišarke								
0.4	1.481	1.932	1.813	0.194	49.88	32.34	36.98	39.73
1.0	1.536	1.909	1.790	0.445	57.54	43.03	47.65	49.40
2.0	1.256	1.378	1.224	0.211	59.31	54.56	60.57	58.15
4.0	1.421	1.323	1.333	0.278	55.52	59.34	58.93	57.93
8.0	0.538	0.506	0.521	0.264	89.36	90.60	90.02	90.00
12.0	0.542	0.810	0.598	0.238	88.19	77.76	85.99	83.98
Kontrola	2.142	3.324	2.954	0.237				
IC ₅₀ (mg/mL)					0.42	1.62	1.28	1.45 ±0.24



Grafik 8.67. Zavisnost inhibicije produkcije 12-HETE (%) – radna koncentracija ekstrakta *J. sibirica*/šišarke; *J. foetidissima*/iglice; *J. foetidissima*/šišarke

Tabela 8.73. Potencijal inhibicije produkcije 12-HETE (*J. oxycedrus*/iglice; *J. sabina*/iglice; *J. sabina*/šišarke - ekstrakti)

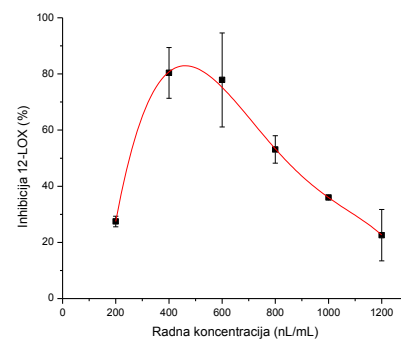
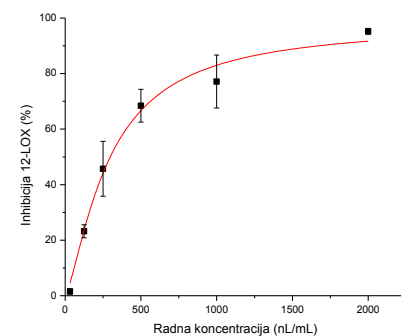
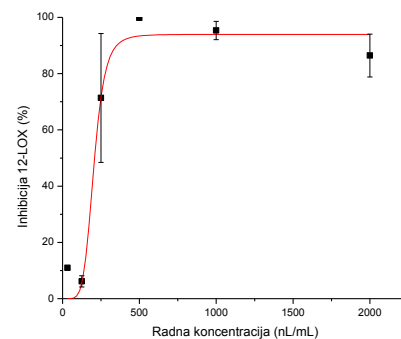
Radna konc. (mg/mL)	12-HETE/PGB ₂				Inhibicija produkcije 12-HETE (%)			
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	Srednja vrednost
<i>J. oxycedrus</i> /iglice								
0.4	2.024	2.889	3.360	0.129	-4.15	-51.67	-77.53	-44.45
1.0	2.197	1.896	1.966	0.254	-6.76	9.76	5.95	7.86
2.0	2.256	2.867	2.658	0.329	-5.87	-39.43	-27.95	-24.42
4.0	1.957	1.884	1.855	0.479	18.79	22.78	24.40	21.99
8.0	1.692	1.542	1.421	0.371	27.46	35.69	42.31	35.15
12.0	0.753	0.961	0.844	0.259	72.85	61.40	67.80	67.35
Kontrola	2.574	1.677	1.821	0.204				
IC ₅₀ (mg/mL)					9.81	10.24	9.04	9.70 ±0.61
<i>J. sabina</i> /iglice								
0.4	2.623	2.153	2.212	0.126	7.45	24.88	22.68	18.34
1.0	1.116	1.290	1.218	0.251	67.93	61.51	64.15	64.53
2.0	1.663	1.513	1.480	0.122	42.90	48.44	49.66	47.00
4.0	1.159	1.127	1.072	0.072	59.73	60.91	62.96	61.94
8.0	0.525	0.441	0.463	0.089	83.84	86.94	86.12	85.39
12.0	0.376	0.387	0.481	0.141	91.28	90.89	87.41	89.86
Kontrola	2.860	3.336	2.333	0.145				
IC ₅₀ (mg/mL)					2.47	2.14	2.10	2.24 ±0.20
<i>J. sabina</i> /šišarke								
0.4	4.651	4.783	4.722	4.092	24.31	6.36	14.64	15.10
1.0	3.262	3.336	3.376	2.774	33.88	23.83	18.41	25.37
2.0	3.513	3.591	3.938	3.327	74.71	64.13	17.16	64.13
4.0	3.083	3.320	3.243	3.000	88.74	56.70	67.10	77.92
8.0	2.923	3.141	3.278	2.918	99.36	69.80	51.28	84.58
12.0	2.859	2.853	2.874	2.846	98.23	99.07	96.20	97.83
Kontrola	4.698	4.434	4.312	3.743				
IC ₅₀ (mg/mL)					1.32	1.57	2.56	1.44 ±0.18



Grafik 8.68. Zavisnost inhibicije produkcije 12-HETE (%) – radna koncentracija ekstrakta *J. oxycedrus*/iglice; *J. sabina*/iglice; *J. sabina*/šišarke

Tabela 8.74. Potencijal inhibicije produkcije 12-HETE (*J. communis*/iglice; *J. communis*/šišarke; *J. macrocarpa*/šišarke – etarska ulja)

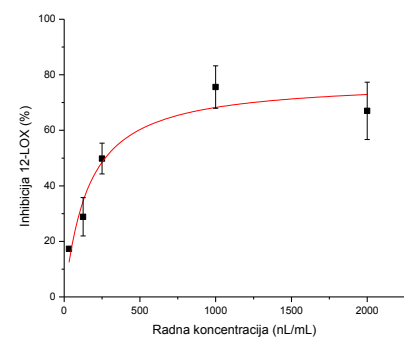
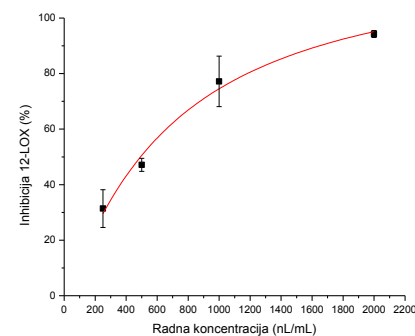
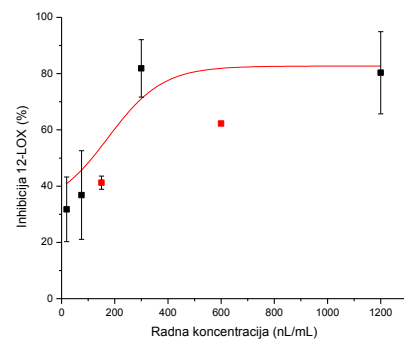
Radna konc. (nL/mL)	12-HETE/PGB ₂				Inhibicija produkcije 12-HETE (%)			
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	Srednja vrednost
<i>J. communis</i> /iglice								
32.0	2.816	3.117	3.192	1.091	10.96	-4.55	-8.42	10.96
125.0	3.408	3.398	3.337	1.562	4.75	5.31	8.43	6.16
250.0	3.203	3.521	4.079	3.046	91.89	75.50	46.68	71.36
500.0	2.817	2.813	2.817	2.813	99.76	99.97	99.75	99.82
1000.0	2.387	2.274	2.378	2.256	93.26	99.10	93.70	95.35
2000.0	1.117	1.157	1.390	0.959	91.86	89.75	77.74	86.45
Kontrola	2.312	2.566	2.531	0.532				
IC ₅₀ (nL/mL)					174.39	204.41	253.95	189.40 ±21.23
<i>J. communis</i> /šišarke								
32.0	3.742	3.775	3.794	1.077	2.54	1.35	0.64	1.51
125.0	4.866	4.755	4.867	2.729	21.85	25.90	21.84	23.20
250.0	4.136	4.650	4.541	2.958	56.92	38.14	42.12	45.73
500.0	4.891	4.917	4.626	3.948	65.53	64.58	75.22	68.44
1000.0	3.705	3.206	3.588	2.874	69.64	87.88	73.89	77.14
2000.0	2.375	2.407	2.349	2.246	95.27	94.10	96.22	95.20
Kontrola	3.076	3.157	3.067	0.365				
IC ₅₀ (nL/mL)					281.83	320.42	290.89	297.71 ±20.18
<i>J. macrocarpa</i> /šišarke								
200.0	7.354	4.418	4.329	1.985	-63.09	26.12	28.80	27.46
400.0	7.490	7.721	7.302	6.865	81.01	73.99	86.74	80.37
600.0	8.402	8.780	8.000	7.661	77.49	66.01	89.70	77.86
800.0	5.657	9.243	9.015	7.585	158.54	49.64	56.56	53.10
1000.0	7.874	8.938	8.950	6.836	68.45	36.15	35.78	35.97
1200.0	7.847	8.396	7.970	5.634	32.77	16.10	29.05	22.57
Kontrola	3.013	3.746	3.591	0.087				
IC ₅₀ (nL/mL)					1147.55	260.24	246.35	253.29 ±9.82



Grafik 8.69. Zavisnost inhibicije produkcije 12-HETE (%) – radna koncentracija etarskog ulja
J. communis/iglice;
J. communis/šišarke;
J. macrocarpa/šišarke

Tabela 8.75. Potencijal inhibicije produkcije 12-HETE (*J. excelsa*/iglice; *J. excelsa*/šišarke; *J. sibirica*/iglice – etarska ulja)

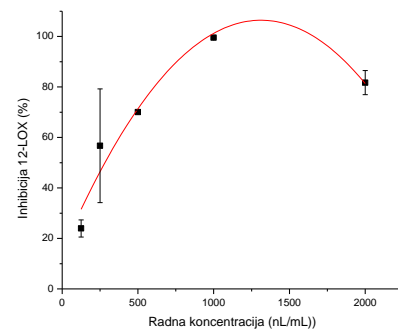
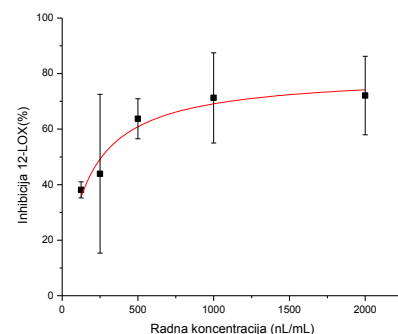
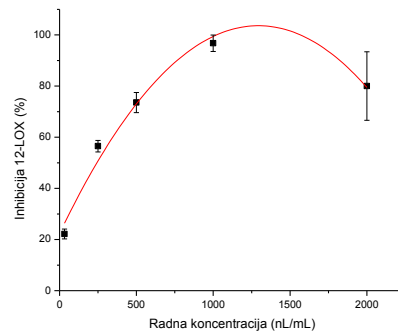
Radna konc. (nL/mL)	12-HETE/PGB ₂				Inhibicija produkcije 12-HETE (%)			
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	Srednja vrednost
<i>J. excelsa</i> /iglice								
19.24	2.462	2.932	3.099	0.868	44.59	28.23	22.44	31.75
75.0	2.571	3.354	3.359	1.278	55.05	27.80	27.66	36.84
150.0	2.912	2.880	2.782	1.168	39.38	40.48	43.88	41.25
300.0	3.191	2.626	2.769	2.340	70.43	90.08	85.10	81.87
600.0	2.545	2.892	2.704	1.460	62.27	50.20	56.72	62.27
1200.0	2.983	2.670	2.152	2.035	67.06	77.93	95.96	80.32
Kontrola	2.984	2.889	3.174	0.140				
IC ₅₀ (nL/mL)					67.53	127.91	136.37	132.14 ±5.98
<i>J. excelsa</i> /šišarke								
32.0	3.550	2.192	2.546	0.857	-119.19	-8.62	-37.46	-55.09
125.0	2.504	1.837	1.852	0.557	-58.42	-4.18	-5.41	-22.67
250.0	1.737	1.851	1.899	0.986	38.89	29.55	25.70	31.38
500.0	1.832	1.884	1.836	1.201	48.63	44.41	48.32	47.12
1000.0	1.547	1.557	1.358	1.207	72.34	71.55	87.67	77.18
2000.0	1.373	1.356	1.387	1.302	94.17	95.58	93.06	94.27
Kontrola	2.495	2.819	2.213	1.280				
IC ₅₀ (nL/mL)					467.09	559.43	467.99	467.54 ±0.64
<i>J. sibirica</i> /iglice								
32.0	2.839	3.353	3.318	0.685	17.33	-2.41	-1.06	17.33
125.0	3.512	3.847	3.791	1.863	36.73	23.85	26.00	28.86
250.0	3.156	2.921	2.894	1.683	43.45	52.50	53.51	49.82
500.0	3.324	3.220	3.272	3.213	95.72	99.73	97.72	97.72
1000.0	3.458	3.086	3.147	2.594	66.85	81.12	78.78	75.58
2000.0	3.087	3.560	3.545	2.538	78.93	60.75	61.36	67.02
Kontrola	2.984	2.889	3.174	0.410				
IC ₅₀ (nL/mL)					348.85	226.20	219.61	222.91 ±4.66



Grafik 8.70. Zavisnost inhibicije produkcije 12-HETE (%) – radna koncentracija etarskog ulja
J. excelsa/iglice;
J. excelsa/šišarke;
J. sibirica/iglice

Tabela 8.76. Potencijal inhibicije produkcije 12-HETE (*J. foetidissima*/iglice; *J. foetidissima*/šišarke; *J. oxycedrus*/iglice – etarska ulja)

Radna konc. (nL/mL)	12-HETE/PGB ₂				Inhibicija produkcije 12-HETE (%)			
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	Srednja vrednost
<i>J. foetidissima</i> /iglice								
32.0	3.746	3.780	3.694	1.958	21.92	20.41	24.20	22.18
125.0	4.150	4.000	3.916	1.293	-24.76	-18.20	-14.55	-19.17
250.0	3.691	3.745	3.793	2.747	58.79	56.43	54.31	56.51
500.0	3.372	3.292	3.472	2.773	73.86	77.35	69.48	73.57
1000.0	2.193	2.326	2.205	2.167	98.86	93.06	98.36	96.76
2000.0	2.653	2.788	2.202	2.090	75.42	69.52	95.15	80.03
Kontrola	1.274	3.434	3.117	0.319				
IC ₅₀ (nL/mL)					233.25	241.88	254.00	243.04 ±10.42
<i>J. foetidissima</i> /šišarke								
32.0	5.972	6.744	7.253	0.127	-4.26	-18.02	-27.10	-16.46
125.0	7.430	3.950	4.179	0.594	-21.92	40.14	36.05	38.10
250.0	5.898	3.023	3.232	0.907	11.00	62.26	58.54	43.93
500.0	7.134	7.940	7.488	5.488	70.65	56.26	64.32	63.75
1000.0	5.275	6.545	7.833	5.578	105.41	82.76	59.78	71.27
2000.0	6.975	8.022	8.531	6.278	87.58	68.90	59.82	72.10
Kontrola	6.602	5.879	4.903	0.188				
IC ₅₀ (nL/mL)					413.48	214.77	243.15	228.96 ±20.07
<i>J. oxycedrus</i> /iglice								
32.0	4.508	2.283	2.441	1.289	-40.58	56.59	49.70	21.90
125.0	4.337	4.244	4.183	2.513	20.35	24.43	27.09	23.96
250.0	4.379	3.360	3.726	2.830	32.36	76.88	60.88	56.71
500.0	3.157	3.152	3.183	2.478	70.36	70.55	69.20	70.03
1000.0	2.381	2.389	2.376	2.372	99.61	99.26	99.80	99.56
2000.0	2.274	2.057	2.147	1.741	76.71	86.21	82.25	81.72
Kontrola	1.274	3.434	3.117	0.319				
IC ₅₀ (nL/mL)					355.31	212.83	258.73	235.78 ±32.46

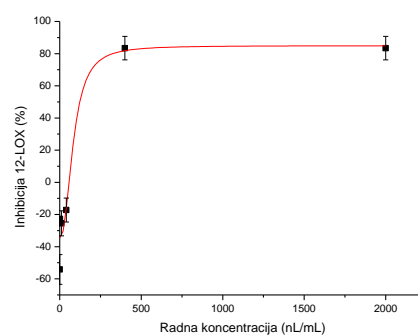
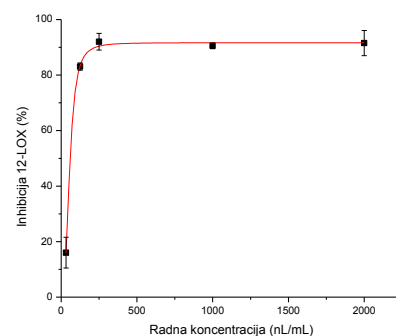
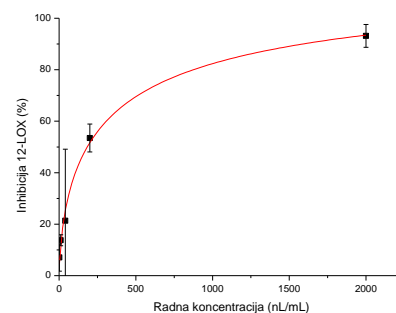


Grafik 8.71. Zavisnost inhibicije produkcije 12-HETE (%) – radna koncentracija etarskog ulja
J. foetidissima/iglice;
J. foetidissima/šišarke;
J. oxycedrus/iglice

Tabela 8.77. Potencijal inhibicije produkcije 12-HETE (*J. sabina*/iglice; *J. phoenicea*/iglice; *J. phoenicea*/šišarke – etarska ulja)

Radna konc. (nL/mL)	12-HETE/PGB ₂				Inhibicija produkcije 12-HETE (%)			
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	Srednja vrednost
<i>J. sabina</i> /iglice								
2.0	5.549	5.070	5.049	0.279	0.92	9.93	10.32	7.06
10.0	4.727	4.871	4.951	0.261	16.05	13.33	11.84	13.74
40.0	3.178	5.587	5.869	0.693	53.29	8.00	2.70	21.33
200.0	2.965	7.096	7.504	4.824	134.95	57.29	49.63	53.46
1000.0	6.669	3.176	3.132	4.063	51.01	116.68	117.52	95.07
2000.0	4.007	4.041	4.433	3.796	96.03	95.39	88.02	93.15
Kontrola	5.188	5.583	5.466	0.093				
IC ₅₀ (nL/mL)					53.34	166.24	202.35	184.29 ±25.53
<i>J. phoenicea</i> /iglice								
32.0	3.683	3.934	3.956	1.561	22.41	13.23	12.42	16.02
125.0	4.885	4.509	4.835	4.397	82.17	95.92	84.00	83.08
250.0	5.862	5.941	6.027	5.725	95.00	92.12	88.96	92.03
500.0	4.674	4.905	4.797	3.253	48.01	39.57	43.53	43.70
1000.0	4.484	4.522	4.467	4.232	90.80	89.41	91.43	90.54
2000.0	3.673	3.427	3.525	3.310	86.72	95.71	92.12	91.52
Kontrola	3.076	3.157	3.067	0.365				
IC ₅₀ (nL/mL)					53.02	56.77	61.40	57.06 ±4.20
<i>J. phoenicea</i> /šišarke								
0.2	7.701	8.478	9.219	0.134	-33.86	-47.61	-60.70	-47.39
2.0	3.706	7.084	6.949	0.074	35.75	-24.02	-21.62	-22.82
10.0	8.120	8.026	7.404	0.621	-32.65	-30.99	-19.99	-27.88
40.0	6.382	6.443	7.039	0.114	-10.89	-11.97	-22.51	-15.12
400.0	14.37	11.21	10.63	9.989	22.74	78.24	88.56	63.18
2000.0	14.35	11.21	10.63	9.989	22.74	78.24	88.56	63.18
Kontrola	5.940	6.789	5.332	0.367				
IC ₅₀ (nL/mL)					n.d.	114.31	122.55	118.43 ±5.83

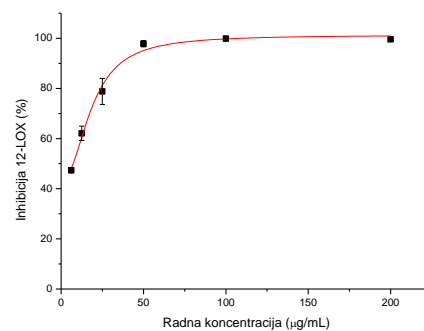
n.d. - IC₅₀ nije dostignuta



Grafik 8.72. Zavisnost inhibicije produkcije 12-HETE (%) – radna koncentracija etarskog ulja
J. sabina/iglice;
J. phoenicea/iglice;
J. phoenicea/šišarke

Tabela 8.78. Potencijal inhibicije produkcije 12-HETE (kvercetin – etarska ulja)

Radna konc. (mg/mL)	12-HETE/PGB ₂				Inhibicija produkcije 12-HETE (%)			
	P ₁	P ₂	P ₃	kor.	I ₁	I ₂	I ₃	Srednja vrednost
kvercetin								
6.24	3.850	3.961	4.000	0.119	48.56	47.04	46.50	47.37
12.48	2.696	3.038	3.075	0.187	65.41	60.69	60.19	62.10
25.0	1.284	2.037	1.699	0.136	84.17	73.79	78.44	78.80
50.0	0.276	0.452	0.397	0.219	99.22	96.78	97.54	97.85
100.0	0.159	0.151	0.142	0.141	99.75	99.86	99.98	99.86
200.0	0.142	0.240	0.140	0.140	99.98	98.63	100.0	99.54
Kontrola	8.213	6.651	7.489	0.197				
IC ₅₀ (mg/mL)					6.75	7.51	8.05	7.44 ±0.65



Grafik 8.73. Zavisnost inhibicije produkcije 12-HETE (%) – radna koncentracija standarda kvercetin

8.4. Antimikrobni potencijal

Tabela 8.79. Antimikrobna aktivnosti etarskih ulja iglica i šišarke ispitivanih vrsta roda *Juniperus* dobijenih disk difuzionom metodom

Etarsko ulje		Zona inhibicije (mm)					
		<i>S. aureus</i> ATCC 11632	<i>C. perfringens</i> ATCC 13124	<i>A. baumannii</i> ATCC BAA-747	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027
<i>Juniperus communis</i>	iglice	n.t.	20.0±0.0	16.0±0.0	15.0±0.0	-	7.0±0.0
	šišarke	n.t.	20.0±0.0	11.0±0.0	12.0±0.0	-	-
<i>Juniperus macrocarpa</i>	iglice	20.7±0.6	32.0±0.0	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
	šišarke	n.t.	16.3±1.9	8.0±2.0	-	-	-
<i>Juniperus excelsa</i>	iglice	22.0±0.0	24.0±0.0	8.0±1.6	8.7±1.5	8.7±0.6	-
	šišarke	14.7±1.2	18.7±0.6	-	-	-	-
<i>Juniperus sibirica</i>	iglice	12.3±0.6	13.0±0.0	-	-	-	-
<i>Juniperus foetidissima</i>	iglice	23.3±1.5	26.3±1.5	16.3±0.3	12.3±1.2	11.3±1.3	8.0±1.2
<i>Juniperus oxycedrus</i>	iglice	15.3±0.6	15.3±1.2	-	-	-	-
<i>Juniperus sabina</i>	iglice	16.7±1.2	21.0±0.0	14.0±0.6	9.7±0.3	-	-
	šišarke	14.0±1.0	12.7±0.6	10.0±0.6	10.0±0.0	-	-
<i>Juniperus phoenicea</i>	iglice	16.7±0.6	16.0±0.0	-	-	-	-
	šišarke	18.0±0.0	10.3±0.6	9.7±0.5	-	-	8.2±1.2
Amikacin		28.0±1.0	21.0±0.0	21.3±0.3	20.0±0.0	19.7±0.3	21.3±0.3
Cefotaksim		32.0±0.0	30.5±0.4	14.3±0.3	27.7±1.9	24.7±0.3	21.3±0.3

n.t. - nije testirano

- - odsustvo zone inhibicije

Tabela 8.80. Antimikrobna aktivnosti etarskih ulja iglica i šišarke ispitivanih vrsta roda *Juniperus* dobijene određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije agar dilucionom metodom

Etarsko ulje		Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) ($\mu\text{L}/\text{mL}$ etarka ulja; $\mu\text{g}/\text{mL}$ standard amikacin)					
		<i>S. aureus</i> ATCC 11632	<i>C. perfringens</i> ATCC 13124	<i>A. baumannii</i> ATCC BAA-747	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027
<i>Juniperus communis</i>	iglice	4	8	8	16	n.u.	n.u.
	šišarke	8	8	≥ 16	≥ 16	n.u.	n.u.
<i>Juniperus macrocarpa</i>	iglice	4	2	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
	šišarke	16	8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
<i>Juniperus excelsa</i>	iglice	4	16	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
	šišarke	8	16	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
<i>Juniperus sibirica</i>	iglice	16	16	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
<i>Juniperus foetidissima</i>	iglice	4	8	8	16	16	n.u.
<i>Juniperus oxycedrus</i>	iglice	8	8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
	šišarke	8	16	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
<i>Juniperus sabina</i>	iglice	4	8	8	16	≥ 16	n.u.
	šišarke	8	16	≥ 16	16	n.u.	n.u.
<i>Juniperus phoenicea</i>	iglice	4	8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
	šišarke	4	16	≥ 16	≥ 16	n.u.	n.u.
Amikacin		4	8	4	4	2	4

n.u. - MIC nije utvrđen

9. SKRAĆENICE

12-HETE	12(S)-hidroksi-(5Z,8Z,10E,14Z)-eikosatetraen-kiselina
12-HHT	12(S)-hidroksi-(5Z,8E,10E)-heptadekatrien-kiselina
ABTS ⁺	2,2-azinobis-(3-etilbenzotiatolin-6-sulfonat) radikalski katjon
AMDIS	<i>Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System</i>
ANS	autonomni nervni sistem
ARDS	adultni respiratorni distres sindrom
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHA	butilovani hidroksianizol (2- <i>terc</i> -butil-4-hidroksianizol i 3- <i>terc</i> -butil-4-hidroksianizol)
BHT	butilovani hidroksitoluen (2,6-di- <i>terc</i> -butil-4-metilfenol)
BK	bradikinin
CGRP	peptid srodan kalcitonin-genu (<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>)
CID	kolizijom indukovana disocijacija (<i>Collision Induced Dissociation</i>)
CNS	centralni nervni sistem
COX	ciklooksigenaza
CYP	citohrom
DAG	diacilglicerol
diHETE	dihidroksieikosatetraen-kiselina
DMSO	dimetil sulfoksid
DPPH [•]	1,1-difenil-2-pikrilhirdazil radikal
EDTA	etilendiamintetrasirćetna kiselina
EET	epoksieikosatrien-kiselina (<i>Epoxy-Eicosatrienoic Acid</i>)
ESI	elektrosprej jonski izvor (<i>Electrospray Ionization</i>)
ESR	elektron spin rezonanca
FC	Folin-Ciocalteu reagens
FLAP	protein koji aktivira 5-lipooksigenazu (<i>Five Lipoxygenase Activating Protein</i>)
FRAP	antioksidantna moć redukcije Fe(III) jona (<i>Ferric Ion Reducing Antioxidant Power</i>)
GC	gasna hromatografija (<i>Gas Chromatography</i>)
GC-FID	gasna hromatografija sa plamenim jonizujućim detektorom (<i>Gas Chromatography - Flame Ionization Detector</i>)
HETE	hidroeikosatetraen-kiselina,
HHT	hidroksiheptadekatrienoat
HORAC	<i>Hydroxyl Radical Averting Capacity</i>
HPETE	hidroperoksieikosatetraen-kiselina
HPLC	tečna hromatografija visokih performansi (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HPLC-MS	tečna hromatografija visokih performansi sa masenim detektorom (<i>High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
HTS	<i>High Throughput Screening</i>
HX	hipoksilin
IL	interleukin
INF	interferon
iNOS	inducibilni oblik NO sintaze

IP	inozitol fosfat
ISSR	<i>Inter-Simple Sequence Repeat</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
KI	Kovats-evi retencioni indeks
KMB	α -ketometiolbuterna kiselina
LC-MS/MS	tečna hromatografija sa tandemskim masenim detektorom (<i>Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry</i>)
LoQ	limit kvantitacije (<i>Limit of Quantitation</i>)
LOX	lipooksigenaza
LT	leukotrien
LX	lipoksin
MDA	malonildialdehid
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
MMC	kalibracione krive matriksa (<i>Matrix-Matched Calibration Curve</i>)
MRM	<i>Multiple Reactions Monitoring</i>
NBT	tetrazolijum nitro-plavo (<i>Nitro-Blue Tetrazolium</i>)
Nf- κ B	<i>Nuclear Factor-kappa B</i>
NK	ćelije prirodne ubice (<i>Natural Killer Cells</i>)
NSAIL	nesteroidni antiinflamatorni lekovi
ORAC	test za određivanje kapaciteta absorpcije kiseoničnog radikala (<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay</i>)
PAF	faktor agregacije trombocita (<i>Platelet Activating Factor</i>)
PCR	lančane reakcije polimeraze (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PG	prostaglandin
PGHS	prostaglandin H sintaza
PGI ₂	prostaciklin
PL	fosfolipaza
PMS	fenazin-metilsulfat
RAPD	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>
RBS	reaktivne vrste broma (<i>Reactive Bromine Species</i>)
RCS	reaktivne vrste hlora (<i>Reactive Chlorine Species</i>)
RNS	reaktivne vrste azota (<i>Reactive Nitrogen Species</i>)
ROS	reaktivne vrste kiseonika (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RSC	kapacitet „hvatanja“ slobodnih radikala (<i>Radical Scavenging Capacity</i>)
SC	standardne kalibracione krive (<i>Standard Calibration Curves</i>)
SNP	natrijum-nitroprusid (<i>Sodium Nitroprusside</i>)
SOD	superoksid dizmutaza
SSE	<i>Signal Suppression/Enhancement</i>
TBA	tiobarbiturna kiselina
TCA	trihlorsirćetna kiselina (<i>Trichloroacetic Acid</i>)
TEAC	antioksidantni kapacitet izražen u ekvivalentima trolox-a (<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>)
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>
TNF- α	α -faktora nekroze tumora (<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>)
TPTZ	2,4,5-tripiridil-s-triazin
TRAP	test za određivanje ukupne antioksidantne sposobnosti „hvatanja“ radikala (<i>Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter Assay</i>)

TrX triksilin
TX tromboksan

9. SKRAĆENICE

12-HETE	12(<i>S</i>)-hidroksi-(5 <i>Z</i> ,8 <i>Z</i> ,10 <i>E</i> ,14 <i>Z</i>)-eikosatetraen-kiselina
12-HHT	12(<i>S</i>)-hidroksi-(5 <i>Z</i> ,8 <i>E</i> ,10 <i>E</i>)-heptadekatrien-kiselina
ABTS ⁺	2,2-azinobis-(3-etilbenzotiatolin-6-sulfonat) radikalski katjon
AMDIS	<i>Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System</i>
ANS	autonomni nervni sistem
ARDS	adultni respiratorni distres sindrom
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHA	butilovani hidroksianizol (2- <i>terc</i> -butil-4-hidroksianizol i 3- <i>terc</i> -butil-4-hidroksianizol)
BHT	butilovani hidroksitoluen (2,6-di- <i>terc</i> -butil-4-metilfenol)
BK	bradikinin
CGRP	peptid srodan kalcitonin-genu (<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>)
CID	kolizijom indukovana disocijacija (<i>Collision Induced Dissociation</i>)
CNS	centralni nervni sistem
COX	ciklooksigenaza
CYP	citohrom
DAG	diacilglicerol
diHETE	dihidroksieikosatetraen-kiselina
DMSO	dimetil sulfoksid
DPPH [•]	1,1-difenil-2-pikrilhirdazil radikal
EDTA	etilendiamintetrasirćetna kiselina
EET	epoksieikosatrien-kiselina (<i>Epoxy-Eicosatrienoic Acid</i>)
ESI	elektrosprej jonski izvor (<i>Electrospray Ionization</i>)
ESR	elektron spin rezonanca
FC	Folin-Ciocalteu reagens
FLAP	protein koji aktivira 5-lipooksigenazu (<i>Five Lipoxygenase Activating Protein</i>)
FRAP	antioksidantna moć redukcije Fe(III) jona (<i>Ferric Ion Reducing Antioxidant Power</i>)
GC	gasna hromatografija (<i>Gas Chromatography</i>)
GC-FID	gasna hromatografija sa plamenim jonizujućim detektorom (<i>Gas Chromatography - Flame Ionization Detector</i>)
HETE	hidroeikosatetraen-kiselina,
HHT	hidroksiheptadekatrienoat
HORAC	<i>Hydroxyl Radical Averting Capacity</i>
HPETE	hidroperoksieikosatetraen-kiselina
HPLC	tečna hromatografija visokih performansi (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HPLC-MS	tečna hromatografija visokih performansi sa masenim detektorom (<i>High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
HTS	<i>High Throughput Screening</i>
HX	hipoksilin
IL	interleukin
INF	interferon
iNOS	inducibilni oblik NO sintaze

IP	inozitol fosfat
ISSR	<i>Inter-Simple Sequence Repeat</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
KI	Kovats-evi retencioni indeks
KMB	α -ketometiolbuterna kiselina
LC-MS/MS	tečna hromatografija sa tandemskim masenim detektorom (<i>Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry</i>)
LoQ	limit kvantitacije (<i>Limit of Quantitation</i>)
LOX	lipooksigenaza
LT	leukotrien
LX	lipoksin
MDA	malonildialdehid
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
MMC	kalibracione krive matriksa (<i>Matrix-Matched Calibration Curve</i>)
MRM	<i>Multiple Reactions Monitoring</i>
NBT	tetrazolijum nitro-plavo (<i>Nitro-Blue Tetrazolium</i>)
Nf- κ B	<i>Nuclear Factor-kappa B</i>
NK	ćelije prirodne ubice (<i>Natural Killer Cells</i>)
NSAIL	nesteroidni antiinflamatorni lekovi
ORAC	test za određivanje kapaciteta absorpcije kiseoničnog radikala (<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay</i>)
PAF	faktor agregacije trombocita (<i>Platelet Activating Factor</i>)
PCR	lančane reakcije polimeraze (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PG	prostaglandin
PGHS	prostaglandin H sintaza
PGI ₂	prostaciklin
PL	fosfolipaza
PMS	fenazin-metilsulfat
RAPD	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>
RBS	reaktivne vrste broma (<i>Reactive Bromine Species</i>)
RCS	reaktivne vrste hlora (<i>Reactive Chlorine Species</i>)
RNS	reaktivne vrste azota (<i>Reactive Nitrogen Species</i>)
ROS	reaktivne vrste kiseonika (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RSC	kapacitet „hvatanja“ slobodnih radikala (<i>Radical Scavenging Capacity</i>)
SC	standardne kalibracione krive (<i>Standard Calibration Curves</i>)
SNP	natrijum-nitroprusid (<i>Sodium Nitroprusside</i>)
SOD	superoksid dizmutaza
SSE	<i>Signal Suppression/Enhancement</i>
TBA	tiobarbiturna kiselina
TCA	trihlorsirćetna kiselina (<i>Trichloroacetic Acid</i>)
TEAC	antioksidantni kapacitet izražen u ekvivalentima trolox-a (<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>)
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>
TNF- α	α -faktora nekroze tumora (<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>)
TPTZ	2,4,5-tripiridil-s-triazin
TRAP	test za određivanje ukupne antioksidantne sposobnosti „hvatanja“ radikala (<i>Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter Assay</i>)

TrX triksilin
TX tromboksan

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:
RBR

Identifikacioni broj:
IBR

Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija
TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal
TZ

Vrsta rada: Doktorska disertacija
VR

Autor: Marija M. Lesjak
AU

Mentor: dr Neda Mimica-Dukić, redovni profesor Prirodno-
matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu
MN

Naslov rada: Biopotencijal i hemijska karakterizacija ekstrakata i
etarskih ulja vrsta roda *Juniperus* L. (Cupressaceae).
NR

Jezik publikacije: Srpski (latinica)
JP

Jezik izvoda: Srpski/engleski
JI

Zemlja publikovanja: Republika Srbija
ZP

Uže geografsko područje: Vojvodina
UGP

Godina: 2011.
GO

Izdavač: Autorski reprint
IZ

Mesto i adresa: Novi Sad; Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad,
Republika Srbija
MA

Fizički opis rada: Broj poglavlja: 9; Strana: 251; Lit. citata: 297; Tabela:
107; Grafika: 73; Slika: 40; Histograma: 18
FO

Naučna oblast: Biohemija
NO

Naučna disciplina: Biohemija lekovitog bilja
ND

**Predmetna odrednica/
Ključne reči:** *Juniperus* L., ekstrakti, etarska ulja, iglice, šišarke, fenoli,
terpenoidi, antioksidantna aktivnost, antiinflamatorna
aktivnost, antimikrobna aktivnost
PO

Čuva se: Biblioteka Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu
životne sredine, Prirodno-matematički fakultet,
Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 3,
21000 Novi Sad, Republika Srbija
ČU

Važna napomena:

VN

Izvod:

-

Karakterizacija metanolnih ekstrakata i etarskih ulja iglica i šiškarki osam vrsta samoniklih kleka (rod *Juniperus* L.) obuhvatala je fitohemijski skrining i ispitivanje antioksidantne, antiinflamatorne i antimikrobne aktivnosti. Primenom LC-MS/MS i GC-MS tehnike detektovan i određen je sadržaj fenolnih i terpenoidnih sekundarnih biomolekula. Antioksidantna aktivnost ekstrakata i etarskih ulja (sposobnost neutralizacije slobodnih radikala, redukcionni potencijal i inhibicija lipidne peroksidacije) ispitana je primenom spektrofotometrijskih metoda. U cilju određivanja antiinflamatornog potencijala, primenjena je *ex vivo* metoda za praćenje aktivnosti trombocitne ciklooksigenaze-1 i 12-lipoksigenaze. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja određena je na šest odabranih bakterijskih sojeva. Ispitani ekstrakti i etarska ulja pokazali su značajnu biološku aktivnost.

IZ

**Datum prihvatanja teme
od strane NN veća:**

21.12.2010.

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

**(Naučni stepen/ime i
prezime/zvanje/fakultet)**

KO

Predsednik:

dr Ksenija Kuhajda, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu

Član:

dr Ivana Beara, docent Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu

Član:

dr Biljana Božin, docent Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu

Član:

dr Goran Anačkov, docent Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES
KEY WORDS DOCUMENTATION**

Accession number:
ANO

Identification number:
INO

Document type: Monography document
DT

Type of record: Printed text
TR

Contents code: PhD Thesis
CC

Author: Marija M. Lesjak
AU

Mentor: Professor Neda Mimica-Dukić, PhD, Faculty of Sciences,
MN University of Novi Sad

Title: Biopotential and chemical characterization of extracts and
essential oils of species from *Juniperus* L. genus
(Cupressaceae).
TI

Language of text: Serbian (Latin)
LT

Language of abstract: Serbian/English
LA

Country of publication: Republic of Serbia
CP

Locality of publication: Vojvodina
LP

Publication year: 2011.
PY

Publisher: Author's reprint
PU

Publishing place: Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Republic of
PP Serbia

Physical description: Chapters: 9; Pages: 251. References: 297; Tables: 107;
PD Figures: 73; Pictures: 40; Charts: 18

Scientific field: Biochemistry
SF

Scientific discipline: Biochemistry of medicinal plants
SD

Subject/Key words: *Juniperus* L., extracts, essential oils, needles, cones,
phenolics, terpenoids, antioxidant activity, anti-
inflammatory activity, antimicrobial activity
SKW

Holding data: Library of Department of Chemistry, Biochemistry and
UC Environmental Protection, Faculty of Sciences, University
of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad,
HD Republic of Serbia

Note:

-

N

Abstract:

Characterization of methanol extracts and essential oils of eight *Juniperus* L. species included phytochemical screening and evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activity. The presence and content of phenolics and terpenoids was confirmed by LC-MS/MS and GC-MS technique. Antioxidant activity of extracts and essential oils (radical scavenger capacity, reduction potential and inhibition of lipid peroxidation) was examined by spectrophotometric methods. With the intention to evaluate anti-inflammatory activity, an *ex vivo* method was applied to measure activity of platelet cyclooxygenase-1 and 12-lipoxygenase. Antimicrobial activity was evaluated according to six bacterial strains. Examined extracts and essential oils showed noticeable biological activity.

AB

Accepted by

the Scientific Board on:

21.12.2010.

ASB

Defended:

DE

Thesis defend board:

**(Degree/name/surname/
title/faculty)**

DB

President:

Professor Ksenija Kuhajda, PhD, Faculty of Sciences,
University of Novi Sad

Member:

Asistant Professor Ivana Beara, PhD, Faculty of Sciences,
University of Novi Sad

Member:

Asistant Professor Biljana Božin, PhD, Faculty of
Sciences, University of Novi Sad

Member:

Asistant Professor Goran Anačkov, PhD, Faculty of
Sciences, University of Novi Sad

BIOGRAFIJA



Marija Lesjak rođena je u Novom Sadu 06.02.1984. godine. Osnovnu školu završila je u Sremskoj Kamenici 1998. godine, a gimnaziju „Jovan Jovanović-Zmaj“ u Novom Sadu 2002. godine. Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu, smer diplomirani hemičar-biohemije upisala je 2002. godine, diplomirala 2007. godine. Tokom osnovnih studija boravila je dva puta u Nemačkoj na usavršavanju. 2007 godine upisala je master studije, smer master biohemije, na PMF-u u Novom Sadu, koje je završila 2008. godine. 2007. godine upisala je doktorske studije (odsek hemija, smer doktor biohemijskih nauka) na PMF-u u Novom Sadu.

U zvanje istraživača-pripravnik za užu naučnu oblast biohemija, izabrana je 2007. godine. U periodu februar 2008. godine – novembar 2009. godine bila je stipendista Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije kao istraživač-doktorant. Godine 2010. izabrana je u zvanje istraživača-saradnika za užu naučnu oblast biohemija. Od novembra 2009. godine zaposlena je na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu u sklopu projekta Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije.

Angažovana je na Katedri za biohemiju i hemiju prirodnih proizvoda Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine PMF-a u Novom Sadu, u izvođenju studenskih vežbi.

Dobitnik je *Dr. Willmar Schwabe* nagrade za mlade istraživače za 2010. godinu koju dodeljuje *Society of Medicinal Plant Research (GA)*, za studijski boravak na *University College London* u Velikoj Britaniji.

Autor je jednog i koautor dva naučna rada koja su objavljena u vodećim međunarodnim časopisima kategorije M21. Takođe, ona je i autor/koautor dvadeset dva naučna saopštenja prezentovana na skupu međunarodnog i sedam saopštenja na skupu nacionalnog značaja.

Član je društva *Society of Medicinal Plant Research (GA)* i *Srpskog hemijskog društva*.

Novi Sad, avgust 2011.

Marija Lesjak