

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

Dejan S. Stojković

**Biološki potencijal i hemijski profil
metanolnih ekstrakata biljaka *Anthriscus
cerifolium* (L.) Hoffm. (Apiaceae), *Ononis
spinosa* L. (Fabaceae) i *Phlomis fruticosa* L.
(Lamiaceae)**

Doktorska disertacija

Beograd, 2022

University of Belgrade

Faculty of Biology

Dejan S. Stojković

**Biological potential and chemical profile of
methanolic extracts of herbs *Anthriscus
cerefolium* (L.) Hoffm. (Apiaceae), *Ononis
spinosa* L. (Fabaceae) and *Phlomis fruticosa*
L. (Lamiaceae)**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

Mentori:

dr Marina Soković, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu – Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković”- Institut od
nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Nemanja Rajčević, docent
Univerzitet u Beogradu – Biološki Fakultet

Članovi komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

dr Ana Džamić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Biološki Fakultet

dr Danijela Drakulić, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu – Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

dr Uroš Gašić, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu – Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković”- Institut od
nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Datum odbrane: _____

Analize sprovedene u ovoj doktorskoj disertaciji su rezultat saradnje sa više institucija: Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju (Univerzitet u Beogradu), Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (Univerzitet u Beogradu) i Politehnički institut u Braganci, Portugal.

Od svog prvog dana provedenog u naučnim istraživanjima uz mene je bila Marina, ostala uz mene i tokom dugog niza godina, a danas je i mentor za izradu moje doktorske disertacije. Veliku zahvalnost dugujem dr Marini Soković, mentoru, koja me je uvela u svet bioloških nauka onog trenutka kad smo se i upoznali i koja je glavna i odgovorna za moju ljubav prema naučnim istraživanjima. Marina, veliko ti hvala za sve!!!

Veliku zahvalnost dugujem i svom mentoru sa Biološkog fakulteta, dr Nemanji Rajčeviću, na efektivnosti, efikasnosti i dostupnosti tokom ovih godina provedenih na doktorskim studijama. Hvala za korisne savete, instrukcije i predusretljivost tokom izrade ove doktorske disertacije.

Ogromnu zahvalnost dugujem i dr Danijeli Drakulić, koja mi je približila svet molekularne biologije i ćelijske kulture. Danijela, hvala ti za predivnu saradnju, za strpljenje, korisne savete i diskusije, što je sve skupa doprinelo da se još više razvijam kao istraživač, a umnogome je doprinelo i finalnom izgledu ove doktorske disertacije. Danijela, hvala ti za sve doprinose, svaku pomoć, duge telefonske razgovore i nezvanično mentorstvo.

dr Urošu Gašiću, našem hemičaru, dugujem ogromnu zahvalnost za veliki trud prilikom izrade dela ove doktorske disertacije koji se odnosi na hemijsku karakterizaciju biljnih ekstrakata. Uroše, veliko hvala za brze reakcije i odgovore.

dr Ani Džamić dugujem takođe veliku zahvalnost za podršku tokom svih ovih godina. Draga Ana, veliko ti hvala za motivaciju, za razumevanje, za savete i što si bila, a i ostala uz mene i tokom izrade moje doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem i mojim prijateljima i saradnicima iz Portugala, dr Isabel CFR Ferreira i dr Lillian Barros koje su mi uvek bile podrška za naučni rad.

Ogromnu zahvalnost dugujem kolegama iz laboratorije, dr Mariji Ivanov, dr Jovani Petrović, dr Marini Kostić, dr Jasmini Glamočliji, dr Ani Ćirić i Tamari Carević za predivnu poslovnu atmosferu. Drage Maro, Jovana i mala Marina, veliko vam hvala za vas doprinos prilikom izrade ovog rada; hvala i za divno drugarstvo. Draga Jasna, hvala ti za nesebičnu podršku i za zagrljaje. Draga Ana, hvala ti za podršku i smirenost. Tamara hvala ti što si nam unela novu energiju. Veliko hvala i svim kolegama na odeljenju za fiziologiju za biljaka.

Veliko hvala i mojim prijateljima na koje sam ponosan: Maji, Magistri, Mikici, Danki, Višnji, Živkili, Mikiju, Jeleni, Nikoleti, Sonji, Tanji. Hvala i mojoj najmlađoj drugarici Iskri, koja ulepšava dane.

Najveću zahvalnost dugujem svom bratu Slaviši, mami i tati za razumevanje, podršku i neizmernu ljubav, a ovu doktorsku disertaciju posvećujem svojoj nani.

Sažetak

Biološki potencijal i hemijski profil metanolnih ekstrakata biljaka *Anthriscus cerefolium* (L.) Hoffm. (Apiaceae), *Ononis spinosa* L. (Fabaceae) i *Phlomis fruticosa* L. (Lamiaceae)

Upotreba biljaka u lečenju ljudi datira još od antičkih vremena. Danas, savremena nauka izučava lekovita svojstva biljaka, potvrđuje njihov etnobotanički značaj i opisuje nove upotrebe biljnih vrsta kao medicinskih sredstava. Cilj ove doktorske disertacije je analiza biološkog potencijala i hemijskog profila metanolnih ekstrakata dobijenih iz nadzemnih delova biljaka *Anthriscus cerefolium*, *Ononis spinosa* i *Phlomis fruticosa*. Biološki potencijal metanolnih ekstrakata je određen testiranjem antibakterijske, antifungalne, antibiofilm, antioksidativne, enzim-inhibitorne, antiproliferativne i anti-inflamatorne aktivnosti. Predstavljen je i uvid u mehanizme antibakterijskog, antifungalnog i antiproliferativnog delovanja ekstrakata. Dobijeni rezultati su ukazali na značajnu antimikrobnu aktivnost ekstrakata protiv patogenih bakterija i gljiva. Takođe, ekstrakti su posedovali antibiofilm aktivnost protiv biofilma bakterija i patogenih kvasnica, kao i aktivnost na neke od faktora virulencije bakterija i kvasnica. Dalje, uočen je značajan antioksidativni potencijal svih ekstrakata, kao i njihova sposobnost inhibicije medicinski važnih enzima. Testirani ekstrakti nisu pokazali toksičnost prema ne-tumorskim humanim primarnim ćelijama, ali su pokazali antiproliferativno dejstvo na tumorske ćelijske linije. Takođe, uočene su i promene morfologije ćelija glioblastoma tretiranih ekstraktom *A. cerefoillum*. Ekstrakti su pokazali anti-inflamatornu aktivnost na *in vitro* modelu bakterijski indukovane inflamacije kod humanih keratinocita kože. Takođe, u okviru ove doktorske disertacije rasvetljen je hemijski sastav polifenola u testiranim ekstraktima i utvrđeno je da dominiraju derivati fenolnih kiselina i flavonoida.

Ključne reči: *Anthriscus cerefolium*; *Ononis spinosa*; *Phlomis fruticosa*; metanolni ekstrakti; biološka aktivnost; hemijska karakterizacija.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Morfologija, fitohemija i sistematika biljaka

Abstract

Biological potential and chemical profile of methanolic extracts of herbs *Anthriscus cerefolium* (L.) Hoffm. (Apiaceae), *Ononis spinosa* L. (Fabaceae) and *Phlomis fruticosa* L. (Lamiaceae)

The use of plants in ethnomedicine dates back to ancient times. Today, modern science explores the healing properties of plants, confirms their ethnobotanical significance and describes new uses of plant species as medicinal agents. The aim of this dissertation is to analyze the biological potential and chemical profile of methanolic extracts obtained from the herbs *Anthriscus cerefolium*, *Ononis spinosa* and *Phlomis fruticosa*. The biological potential of methanolic extracts was determined by testing antibacterial, antifungal, antibiofilm, antioxidant, enzyme-inhibitory, antiproliferative and anti-inflammatory activities. An insight into the mechanisms of antibacterial, antifungal and antiproliferative actions was also presented. The chemical composition of methanol extracts has been studied both qualitatively and quantitatively. The obtained results indicated significant antimicrobial activity of the extracts against pathogenic bacteria and fungi. Also, the extracts possessed antibiofilm activity against bacterial and yeasts biofilms, as well as the activity on some of the virulence factors of bacteria and yeasts. Furthermore, significant antioxidant potential of all extracts was observed, as well as their ability to inhibit medically important enzymes. The extracts did not show toxicity to human primary cells, but showed antiproliferative effect on tested tumor cell lines. Also, the changes in the morphology of glioblastoma cells treated with the methanol extract of *A. cerefolium* were observed. The extracts showed anti-inflammatory activity in *in vitro* model of bacterial-induced inflammation of human skin keratinocytes. Furthermore, the chemical composition of polyphenols in the tested extracts was clarified and was determined that derivatives of phenolic acids and flavonoids dominate.

Ključne reči: *Anthriscus cerefolium*; *Ononis spinosa*; *Phlomis fruticosa*; methanolic extracts; biological activity; chemical characterization.

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Morphology, phytochemistry and systematics of plants

Slike

Slika 1. Preuzeto sa interneta

- a) https://cdn1.img.rs.sputniknews.com/img/07e5/02/02/1124527850_0:0:796:768_1920x0_80_0_0_e05a57d79cad5c581c1e9f456b7bc257.jpg;
- b) https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pen_ts%27ao,_woodblock_book_1249-ce.png;
- c) <https://curiosmos.com/wp-content/uploads/2020/08/ebers-papyrus-scaled.jpg>;
- d) https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/04/Dioscorides_De_Materia_Medica_Spain_12th_13th_century.jpg;

Slika 2. Preuzeto sa interneta

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:20150423Anthriscus_cerofolium1.jpg

Slika 3. Preuzeto iz rada [13] (open access)

Slika 4. Preuzeto sa interneta

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/1e/Ononis_spinosa_2.jpg

Slika 5. Preuzeto iz rada [15] (open access)

Slika 6. Preuzeto sa interneta

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/88/0_Phloemis_fruticosa_-_Samo%C3%ABns_%282%29.JPG

Slika 7. Preuzeto iz rada [20] (License Number 5274931205494, Oxford University Press)

Slika 9. Preuzeto sa interneta

<https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRBIONaO3XYhzU-LQT-E3FnaCeQs9IPAtSyTg&usqp=CAU>

Slika 8 i Slike 10-37 delo autora

Sadržaj

1	UVOD	1
1.1	Klasifikacija i morfološke karakteristike ispitivanih vrsta.....	3
1.1.1	Rod <i>Anthriscus</i> Pers.....	3
1.1.1.1	<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm. (Apiaceae) – krbuljica.....	3
1.1.1.1.1	Makroskopske karakteristike <i>A. cerefolium</i>	3
1.1.1.1.2	Histo-anatomske karakteristike <i>A. cerefolium</i>	4
1.1.2	Rod <i>Ononis</i> L.....	5
1.1.2.1	<i>Ononis spinosa</i> L. (Fabaceae) – zečji trn.....	6
1.1.2.1.1	Makroskopske karakteristike <i>O. spinosa</i>	6
1.1.2.1.2	Histo-anatomske karakteristike <i>O. spinosa</i>	7
1.1.3	Rod <i>Phlomis</i> L.....	9
1.1.3.1	<i>Phlomis fruticosa</i> L. (Lamiaceae) – grmolika gostanka.....	9
1.1.3.1.1	Makroskopske karakteristike <i>P. fruticosa</i>	9
1.1.3.1.2	Histo-anatomske karakteristike <i>P. fruticosa</i>	10
1.2	Etnobotanička upotreba ispitivanih vrsta	13
1.2.1	Etnobotanička upotreba biljaka iz roda <i>Anthriscus</i>	13
1.2.2	Etnobotanička upotreba biljaka iz roda <i>Ononis</i>	13
1.2.3	Etnobotanička upotreba biljaka iz roda <i>Phlomis</i>	13
1.3	Antimikrobna, antioksidativna i anti-inflamatorna aktivnost vrsta rodova <i>Anthriscus</i> , <i>Ononis</i> i <i>Phlomis</i>	15
1.3.1	Antimikrobna aktivnost	15
1.3.2	Antioksidativna aktivnost.....	17
1.3.3	Anti-inflamatorna aktivnost	18
1.4	Biološki aktivna polifenolna jedinjenja	20
1.4.1	Struktura i klasifikacija polifenolnih jedinjenja	20
1.4.2	Biološka aktivnost polifenola	21
1.4.3	Flavonoidi kod vrsta rodova <i>Anthriscus</i> , <i>Ononis</i> i <i>Phlomis</i>	23
2	CILJEVI.....	25
3	MATERIJAL I METODE.....	26
3.1	Poreklo biljaka i skladištenje biljnog materijala	26
3.2	Priprema metanolnih ekstrakata	27

3.3	Ispitivanje biološkog potencijala metanolnih ekstrakata <i>A. cerefolium</i> , <i>O. spinosa</i> i <i>P. fruticosa</i>	28
3.3.1	Reagensi.....	28
3.3.2	Ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata	28
3.3.2.1	Ispitivanje antibakterijske aktivnosti.....	28
3.3.2.2	Ispitivanje efekta ekstrakata na sposobnost formiranja biofilma <i>S. aureus</i>	29
3.3.2.3	Ispitivanje inhibicije produkcije stafiloksantina kod bakterije <i>S. aureus</i>	30
3.3.2.4	Ispitivanje antifungalne aktivnosti	30
3.3.2.5	Ispitivanje uticaja ekstrakata na formiran biofilm odabranih <i>Candida</i> sojeva	31
3.3.2.6	Ispitivanje uticaja ekstrakata na integritet ćelijske membrane <i>C. albicans</i>	32
3.3.2.7	Ispitivanje uticaja ekstrakata na ergosterol.....	32
3.3.3	Ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata	33
3.3.3.1	DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) metoda.....	33
3.3.3.2	ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-sulfonska kiselina) metoda	34
3.3.3.3	CUPRAC (eng. "cupric ion reducing activity") metoda	34
3.3.3.4	FRAP (eng. "ferric reducing antioxidant power") metoda.....	35
3.3.3.5	Test sa fosfomolibdatom	35
3.3.3.6	Test sposobnosti heliranja jona metala.....	36
3.3.4	Ispitivanje enzim-inhibitorne aktivnosti ekstrakata	37
3.3.4.1	Inhibicija holinesteraza	37
3.3.4.2	Inhibicija tirozinaze.....	37
3.3.4.3	Inhibicija amilaze i glukozidaze.....	37
3.3.5	Ispitivanje antiproliferativnog potencijala ekstrakata	38
3.3.5.1	Ćelijske linije i uslovi gajenja	38
3.3.5.2	Ispitivanje antiproliferativnog potencijala ekstrakta	40
3.3.5.3	Imunofluorescentna citohemijska analiza	40
3.3.6	Ispitivanje anti-inflamatornog potencijala ekstrakata određivanjem nivoa IL-6 i IL-8 u HaCaT ćelijama.....	41
3.4	Hemijska analiza ekstrakata.....	42
3.4.1	UHPLC-LTQ-Orbitrap/MS ⁿ kvalitativna analiza i hemijski profil ekstrakata...	42
3.4.2	LC-DAD-ESI/MS ⁿ hemijska analiza i kvantifikacija jedinjenja	43
4	REZULTATI I DISKUSIJA.....	44

4.1	Analiza prinosa ekstrakata	44
4.2	Analiza antibakterijske aktivnosti	44
4.2.1	Analiza efekata ekstrakata na formiranje bakterijskog biofilma.....	47
4.2.2	Analiza efekata ekstrakata na produkciju stafiloksantina kod bakterije <i>S. aureus</i>	48
4.3	Analiza antifungalne aktivnosti ekstrakata	49
4.3.1	Aktivnost ekstrakata na formiran biofilm vrsta roda <i>Candida</i>	53
4.3.2	Analiza efekata ekstrakata na integritet ćelijske membrane kvasca <i>C. albicans</i> ..	54
4.3.3	Analiza efekata ekstrakata na ergosterol kod <i>C. albicans</i>	55
4.4	Antioksidativna aktivnost ekstrakata	57
4.5	Enzim-inhibitorna aktivnost ekstrakata	60
4.6	Analiza antiproliferativne aktivnosti ispitivanih ekstrakata.....	64
4.6.1	Analiza efekata ekstrakata na morfologiju A172 ćelija glioblastoma i na ekspresiju Ki67 markera proliferacije	65
4.7	Analiza anti-inflamatornog potencijala ekstrakata.....	71
4.8	UHPLC-LTQ-Orbitrap/MS kvalitativna analiza i hemijski profil ekstrakata	72
4.9	HPLC-DAD-ESI/MS ⁿ analiza i kvantifikacija jedinjenja u ekstraktima <i>A. cerefolium</i> , <i>O. spinosa</i> i <i>P. fruticosa</i>	88
5	OPŠTA DISKUSIJA.....	96
6	ZAKLJUČCI.....	101
7	LITERATURA.....	103
8	PRILOZI	120

1 UVOD

Lečenje biljkama staro je koliko i samo čovečanstvo. Čovekova potreba za lekovima, koje je svojevremeno tražio prevashodno u prirodi, potiče iz daleke prošlosti, o čemu postoji mnogo dokaza iz različitih izvora: sačuvanih spomenika, pisanih dokumenata, pa čak i izvornih biljnih lekova. Najstariji pisani dokazi o upotrebi lekovitih biljaka pronađeni su na sumerskoj glinenoj ploči iz Nagpura, staroj oko 5000 godina (**Slika 1A**). Zapis je sadržao 12 recepata za pripremu lekova sačinjenih od preko 250 biljnih vrsta uključujući mak i mandragoru, u kojima se nalaze alkaloidi [1,2].

Brojni podaci o tradicionalnoj upotrebi biljaka u lekovite svrhe potiču i iz tradicionalne kineske medicine. Tako, kineska knjiga o korenju i travama "Pen T'Sao" (**Slika 1B**), koju je napisao car Shen Nung oko 2500. godine pre Hrista opisuje 365 biljnih lekova, od kojih se mnogi koriste i danas: *Rhei rhisoma*, kamfor, list čajnog drveta, veliki žuti encijan, žen-šen, kora cimeta i efedra [3].

Papirus Eberus (**Slika 1C**), napisan oko 1550. pre nove ere (pne) u Egiptu, predstavlja zbirku od 800 propisa koji se odnose na 700 biljnih vrsta koje se koriste u terapiji, poput nara, ricinusa, aloe, sene, luka, smokve, vrbe, korijandera, smreke itd. Prema podacima iz Biblije i svete jevrejske knjige Talmud, tokom različitih rituala u zemljama Bliskog istoka, koristile su se aromatične biljke poput mirte i tamjana [1].

U Homerovim epovima Ilijada i Odiseja (oko 800. gpne), spomenute su 63 biljne vrste korišćene u minojskoj, mikenskoj i egipatskoj farmakoterapiji. Neke od njih dobile su imena po mitološkim likovima iz Homerovih epova; na primer, *Inula helenium* L. (Asteraceae) dobila je ime u čast Jelene, koja je bila povod Trojanskog rata. Ime biljaka iz roda *Artemisia*, za koje se verovalo da obnavljaju snagu i štite zdravlje, izvedeno je od grčke reči *artemis*, što znači "zdrava". Pored toga, Hipokratova dela sadrže podatke o korišćenju čak 300 vrsta biljaka u terapeutske svrhe: npr. pelin (*Artemisia vulgaris* L.) i obični stogodišnjak (*Centaureum umbellatum* Gilib) primenjivani su protiv groznice; luk protiv crevnih parazita; opijum je upotrebljavan kao opojna droga; mirisna kukuljica i lešnik protiv povraćanja; morski luk, celer i peršun kao diuretici; hrast i šipurak kao adstringensi. Dalje, Teofrast (370-285. gpne) je utemeljio klasifikaciju više od 500 lekovitih biljaka poznatih u to vreme, zahvaljujući čemu se često naziva „ocem botanike“. Dioskorid, koji se smatra „ocem farmakognozije“, napisao je delo „*De Materia Medica*“ (**Slika 1D**). Od ukupno 944 opisanih lekova, čak 657 je biljnog porekla, a među najcenjenijim vrstama tog vremena bili su vrba, kamilica, beli luk, crni luk, močvarni slez, bršljen, kopriva, kantarion, korijander, peršun itd. [1].

U srednjem veku veštine lečenja, gajenja lekovitih biljaka i pripreme lekova preselile su se u manastire, a većina tadašnjih terapija se zasnivala na upotrebi lekovitih biljaka, koje su uglavnom bile uzgajane unutar zidina manastira: žalfija, anis, nana itd. [1].

Početak 19. veka smatra se prekretnicom u upotrebi lekovitih biljaka u terapeutske svrhe. Otkriće i izolacija alkaloida iz maka (1806. godine) i drugih biljaka, a potom i izolacija glikozida, označili su početak naučnog pristupa u upotrebi biljaka u lečenju. Uz razvoj hemijskih metoda otkrivene su i druge bioaktivne komponente lekovitih biljaka poput tanina, saponina, etarskih ulja, vitamina i hormona [4].



Slika 1. Pisani dokazi o upotrebi lekovitih biljaka kroz istoriju, redom: **A)** Sumerska glinena ploča iz Nagpura, **B)** Pen T'Sao, **C)** papirus Eberus, **D)** De Materia Medica (Slike preuzete sa interneta i modifikovane)

Danas se sa pravom može reći da je savremena nauka prepoznala potencijal lekova prirodnog porekla, te je u modernu farmakoterapiju uključen niz biljnih terapeutika (fitoterapeutika) koji su tekovina drevnih civilizacija. Tako, gotovo sve farmakopeje na svetu, uključujući deseto izadnje Evropske farmakopeje (Ph Eur 10, 2020), farmakopeja Sjedinjenih Američkih Država (USP 31, 2008) i Britanska farmakopeja (BP, 2007), propisuju biljne lekove, a postoje i zemlje (Ujedinjeno Kraljevstvo, Rusija, Nemačka) koje imaju zasebne biljne farmakopeje [5]. Njihova primena zasniva se na iskustvima tradicionalne medicine ili na novim naučnim istraživanjima i eksperimentalnim rezultatima (konvencionalna medicina), a koriste se samostalno ili u kombinaciji sa sintetičkim lekovima (komplementarna medicina). Kao terapijska sredstva primenjuju se najčešće preparati sa identifikovanim aktivnim komponentama i proverenim terapijskim delovanjem [1,5].

S obzirom na značaj lekovitih biljaka za čovečanstvo, kako kroz istoriju tako i u savremenom dobu, predmet ispitivanja ove doktorske disertacije je rasvetljavanje biološkog potencijala metanolnih ekstrakata biljaka *Anthriscus cerefolium* (L.) Hoffm. (Apiaceae), *Ononis spinosa* L. (Fabaceae) i *Phlomis fruticosa* L. (Lamiaceae). Imajući u vidu taksonomske razlike, ali i sličnosti u primeni vrsta *A. cerefolium*, *O. spinosa* i *P. fruticosa* u kulinarstvu (jestive biljke) [6–9], i slično opisanu primenu vrsta u etnobotanici i savremenoj nauci (kod infekcija, upala i bolova) [6,10,11], ove tri vrste su odabrane za uporedno ispitivanje njihovih bioloških aktivnosti i hemijskog sastava, kako bi se rasvetlio njihov biološki potencijal i predložila potencijalno nova lekovita svojstva. S obzirom da su biljke bogate biološki aktivnim polifenolima, a poznato je da je metanol jedan od najpogodnijih rastvarača za ekstrakciju ove grupe jedinjenja, predmet ispitivanja u ovoj doktorskoj disertaciji će biti metanolni ekstrakti dobijeni iz nadzemnih delova ovih vrsta.

1.1 Klasifikacija i morfološke karakteristike ispitivanih vrsta

1.1.1 Rod *Anthriscus* Pers.

Rod *Anthriscus* pripada porodici Apiaceae i obuhvata jednogodišnje, dvogodišnje ili višegodišnje biljke. Stablo biljke je uglavnom oblo, sa ili bez trihoma, prugasto ili izbrazdano, dok su listovi 2-3 puta perasto deljeni, dlakavi ili goli. Kod većine vrsta, involukrum nije formiran, dok je involuceum sastavljen od manjeg broja listića. Cvetovi mogu biti hermafroditni i muški. Čašica cveta je slabo izražena, dok su listići krunice mali i goli; spoljašnji mogu biti ponekad veći. Boja kruničnih listića varira od bele do zelenkaste ili žućkaste. Plod je izduženog jajastog oblika i na vrhu često sužen, dok su plodovi na vrhu zaobljeni, sa 5 formiranih rebara. Stilopodijum je kupastog oblika. Rod obuhvata oko 12 vrsta rastrostranjenih u Evropi i Aziji, dok su u Srbiji zastupljene 4 vrste: *A. sylvestris*, *A. nemorosa*, *A. cerefolium* i *A. caucalis* [12].

1.1.1.1 *Anthriscus cerefolium* (L.) Hoffm. (Apiaceae) – krbuljica

1.1.1.1.1 Makroskopske karakteristike *A. cerefolium*

Predstavnici vrste *A. cerefolium* su jednogodišnje aromatične biljke sa tankim vretenastim korenom sivkasto-žućkasto-bele boje, koji je na poprečnom preseku beličast [12]. Stabljika je visine 15-70 cm, šuplja, uspravna, oko 5mm debela i razgranata. Ispod nodusa se nalaze razvijene trihome, a sama stabljika je inače gola. Stabljika je zelene boje, ponekad sa plavičastom prugom (**Slika 2**) [12,13]. Listovi su naizmenični, meki, svetlo zeleni, bez trihoma osim po obodu i naličju gde formiraju trihome na nervima. Donji listovi imaju formirane drške, dok su gornji sedeći i 2-3 puta perasto deljeni [12,13]. Štitovi su na kraćim ili dužim drškama; bočni su sedeći, sa 3-6 zrakova. Involukrum najčešće odsutan, dok je involuceum sastavljen od 1-4 linearno-lancetastih, trepljasto dlakavih listića. Štitovi su složeni, ravni ili blago konveksni, visine 2,5-3,5 cm, širine 4-8 cm. Cvetovi su mali, bele ili belo-ružičaste boje. Krunični listići su duguljasto zaobljeni, 1,2-2,5 mm dugi, 0,7-1,7 mm široki, na vrhu urezani, po obodu štita veći od ostalih. Plod je šizokarpijum, koji se nakon sazrevenja cepa na dva merikarpa linearno-lancetastog oblika; dužine je 7-11 mm, širine 1,5 mm, sa izduženim vrhom. Zreo plod je gladak ili čekinjasto dlakav. Žigovi su uspravni, duži od stilopodijuma [12,13].

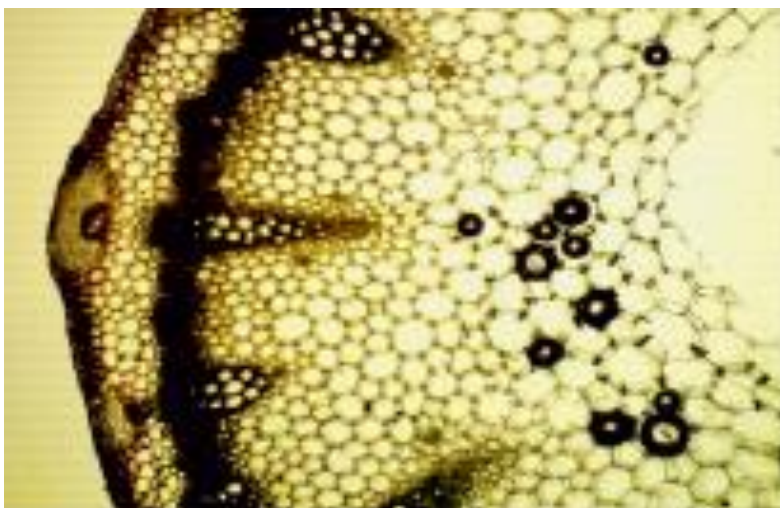


Slika 2. *Anthriscus cerefolium*
(preuzeto sa interneta)

1.1.1.1.2 Histo-anatomske karakteristike *A. cerefolium*

Anatomske karakteristike korena. Koren je na poprečnom preseku zaobljen. Kod sekundarno građenog korena postoje dva tipa tkiva: pokorično tkivo i centralni cilindar, dok je na površini formirana pluta. Centralni cilindar obuhvata pericikl, floem, kambijum, primarni i sekundarni ksilem, kao i parenhim radijalnih zraka. Pericikličnu zonu predstavljaju parenhimske ćelije, dok su u floemu izdiferencirane sitaste ćelije i bočni parenhim. Između ksilema i floema nalazi se sloj kambijuma. Sekundarni ksilem obuhvata sudove različitih veličina. Primarni ksilem je triarhan, a provodni snopići obrazuju protostelu [13].

Anatomske karakteristike stabla. Anatomija stabla proučena je na poprečnim presecima u gornjem, srednjem i donjem delu biljke u području internodija (**Slika 3**). Stabljika je okruglog-rebrastog oblika. Pokorično tkivo je predstavljeno jednim slojem epidermisa, dok se subepidermalna zona sastoji od uglastog kolenhima, koji se formira u obliku ostrvaca duž celog perimetra stabljike, između kojih je asimilacijski parenhim (hlorenhim). U parenhimu korteksa nalaze se strukture šizogenog porekla. Endoderm je slabo diferenciran. Spoljašnji sloj centralnog cilindra predstavljen je sklerenhimom koji formira pericikl, a provodni snopići grade eustelu. Središnji parenhim predstavljen je okruglim granularnim ćelijama [13].



Slika 3. Fragment poprečnog preseka stabla *A. cerefolium* (uveličanje 40x), [13].

Anatomske karakteristike lisne drške. Epidermis je prekriven dugim jednostavnim jednoćelijskim trihomama. Provodni sistem je predstavljen kolateralnim snopićima dorzoventralnog tipa; središnji snopić je zaobljen, ima šest bočnih snopića, dok su iznad snopića prisutni šizogeni intercelulari [13].

Anatomske karakteristike lista. Pri proučavanju mikroskopskih preparata epidermisa lica lista utvrđeno je da su antiklinalni zidovi glavnih ćelija ravni. Epidermis je bez stoma i nema trihoma. Kod epidermisa naličja listova antiklinalni zidovi glavnih ćelija su zakrivljeni, sa brojnim stomama (hipostomatičan list) anomocitnog tipa. Lisni nervi su prekriveni prozenhimskim epidermskim ćelijama. Trihome na epidermisu naličja lista su jednostavne jednoćelijske, duže uz nervaturu lista i kratke duž oboda lista [13].

1.1.2 Rod *Ononis* L.

Rod *Ononis* pripada porodici Fabaceae. Predstavnik ove porodice čine višegodišnje zeljaste biljke, poluzbunovi ili žbunovi, često pokriveni trnovima ili lepljivim, žlezdastim trihomama. Listovi su sa kratkom lisnom drškom ili sedeći; većinom su tročlani, sa tri nazubljena listića, a na cvetnim izdancima prosti, sa jednim listićem. Zalisci su najčešće krupni i listoliki, nazubljeni i srasli sa osnovom lisne drške. Cvetovi mogu biti postavljeni pazušno – pojedinačno ili po dva, ili su složeni u kratke štitaste ili grozdaste cvasti; najčešće se nalaze na krajevima grana složeni u prividne grozdaste cvasti. Krunica je ružičaste do crvene boje, ređe bele ili žute. Čašica je zvonastog oblika, ređe cevasta, duboko deljena u 5 skoro podjednakih zubaca ili dvousnata. Zastavica je velika, skoro okrugla, sa kratkim nokatcem; krila su izduženo obrnuto jajasta; čunić savijen, produžen u kljun. Prašnici su prošireni u gornjem delu i srasli, dok je tučak sa većom ili manjom drškom; stubić je dugačak, većinom pljosnat i go, iskrivljen ili skoro kolenasto savijen, sa glavičastim ili neznatno iskošenim žigom. Plod je izduženo jajasta do linearna mahuna, naduvana ili okrugla, ređe spljoštena sa 3 kapka kojima se otvara, dok je seme loptastog ili bubrežastog oblika [14].

Rod obuhvata oko 70 vrsta sa arealom rasprostranjenja većinom u Sredozemlju, a manje u srednjoj i severnoj Evropi. U Srbiji rastu 4 vrste roda *Ononis* [14].

1.1.2.1 *Ononis spinosa* L. (Fabaceae) – zečji trn

1.1.2.1.1 Makroskopske karakteristike *O. spinosa*

Nadzemni deo biljke (**Slika 4**) je žbun sa snažnim, glavnim korenom, dok stolone nisu razvijene. Listovi imaju kratku lisnu dršku ili su sedeći; donji su tročlani, sa krupnijim vršnim listićem koji ima i dužu lisnu dršku, dok su gornji, naročito u cvetnom regionu prosti. Zalisci su veliki, polujajasti, nazubljeni i obuhvataju stabljiku. Grane žbuna su poliuspravljene ili uspravne, visine 30-70 cm, većinom pokrivene krutim i čvrstim trihomama [14].



Slika 4. Habitus *Ononis spinosa*
(preuzeto sa interneta)

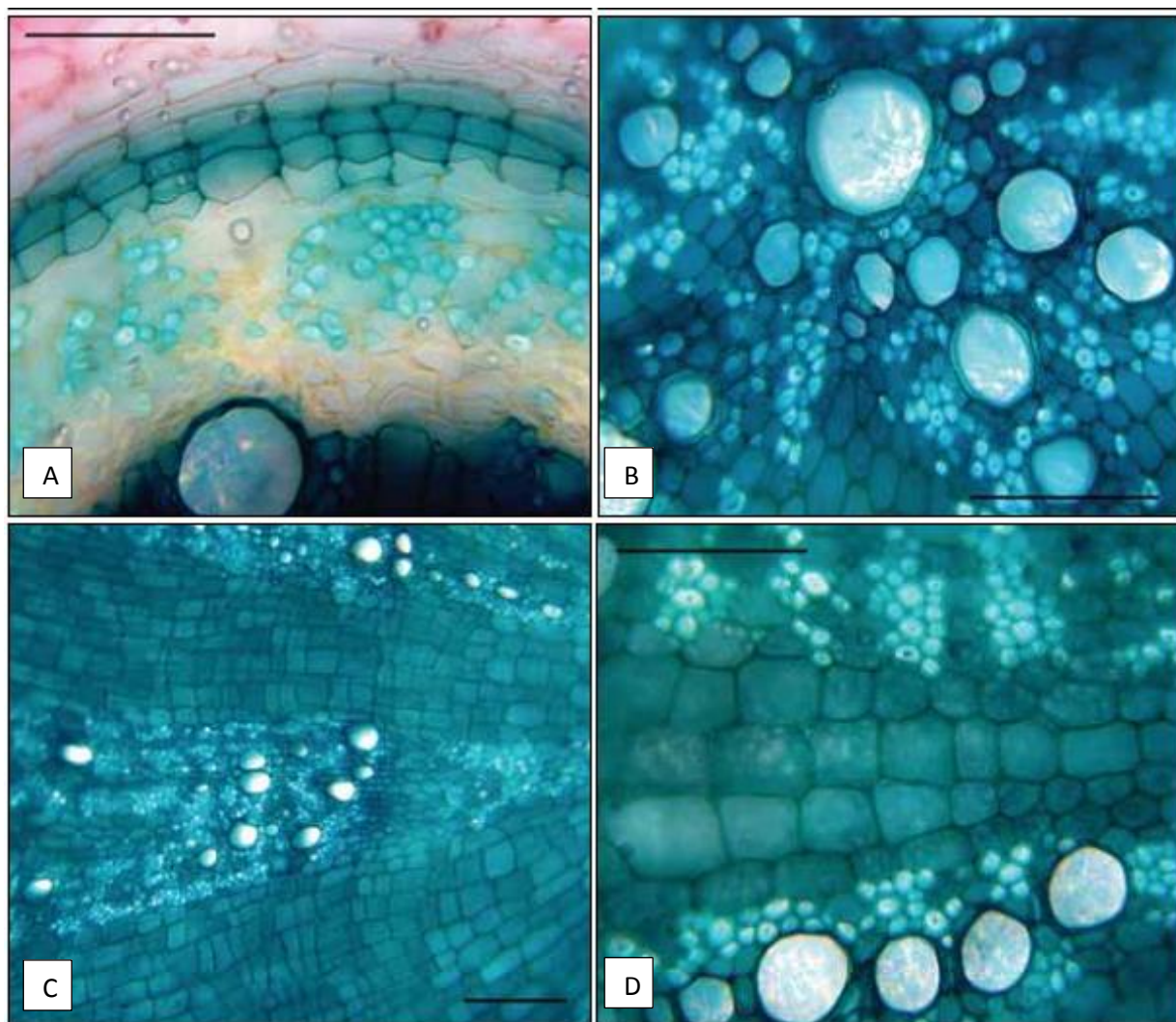
Trihome su prugasto složene u jedan ili dva reda naizmenično duž internodija, a katkad mogu biti žlezdaste. Bočni izdanci se završavaju čvrstim, često razgranatim trnovima. Cvetovi su dužine 6-25 mm, pojedinačno raspoređeni. Retko su po dva cveta postavljena pazušno na bodljikavim kratkim bočnim izdancima, na kojima mogu formirati rastresite ili guste grozdaste cvasti. Čašica je mnogo duža od kratke cvetne drške, dvousnata i pokrivena dugačkim proređenim dlakama i žlezdama; zupci su lancetasti, 3-4 puta duži od čašične cevi. Krunični listići su ružičaste boje, ređe svetloružičasti ili beli,

prožeti tamnim žilama; dva puta su duži od čašice. Zastavica je okruglasta i na vrhu tupa, spolja većinom pokrivena žlezdastim dlakama. Prašničke kesice su naizmenično okrugle i jajaste, dok je plodnik jajast, sa 2-3 semena zametka. Plod je izduženo jajast, dužine oko 7 mm; zreo je duži od čašice, pokriven mekim dlakama i žlezdama, većinom samo sa jednim, ređe dva semena. Seme je okruglasto i mrko, poprskano tamnijim pegama. Vrsta *O. spinosa* je rasprostranjena širom Evrope, kao i u zapadnoj Aziji i severnoj Africi [14].

1.1.2.1.2 Histo-anatomske karakteristike *O. spinosa*

Anatomske karakteristike korena. U donjoj trećini poprečnog preseka korena se uočava rizodermis sa apsorpcionim dlakama. Ostatak kortikalnog parenhima je mesnatog tipa sa vrlo velikim ćelijama nepravilnog oblika i tankih ćelijskih zidova. Od ćelija endodermisa i pericikla nastaje felogen koji formira 2-3 sloja plute u blizini tkiva floema. Centralni cilindar se sastoji od spoljašnjeg prstena sekundarnog floema i centralnog tela sekundarnog ksilema [15].

Prsten sekundarnog floema obuhvata tri zone odvojene parenhimsko-celuloznim medularnim zracima; ta područja sadrže nekoliko provodnih elemenata (sitaste cevi i ćelije pratilice) prema unutra i brojna likina vlakna (**Slika 5A**) odvojena ćelijama floemskog parenhima. Sekundarni ksilem (**Slika 5B**) predstavljen je sa 6 sektora odvojenih vrlo velikim parenhimsko-celuloznim medularnim zracima, koji se ne nalaze u središtu korena (aksijalno područje); ti sektori uključuju sudove različite veličine koji su nepravilno raspoređeni u libriformnoj masi. I likina vlakna i libriforma imaju vrlo debele zidove, ali su umereno lignifikovana. Postojanje tri sektora floema i tri para ksilemskih sektora dokaz je da je aksijalni cilindar (stela) u primarnoj strukturi triarhni [15].



Slika 5. (A-D) Poprečni presecci na različitim nivoima korena *Ononis spinosa* [15].

U srednjoj trećini poprečnog preseka korena pojavljuju se 3–4 tanje zone (jednoslojne ili dvoslojne) plute, odvojene parenhimom koje grade ritidom. Floem stvara pun prsten u kome se smenjuju područja sekundarnog floema s područjima celuloznog parenhima; ovo, zajedno s lignifikovanim parenhimom iz sekundarnog ksilema formira pravi parenhim širenja (**Slika 5 C, D**). U floemu i posebno u nivou ksilema, ima 12 područja sekundarnog provodnog tkiva, odvojenih parenhimskim medularnim zracima različitih širina. Srž korena je kompaktna, s nekoliko ksilemskih sudova i mnogim libriformnim vlaknima [15].

U bazalnoj trećini korena pluta je deblja (3–5 ćelijskih slojeva), a centralno telo ksilema je vrlo debelo. Koren ove biljke je jako parenhimatičan, a ćelije iz parenhima medularnih zraka su ispunjene skrobnim granulama [15].

Histo-anatomske karakteristike biljnih organa, izuzev korena, *O. spinosa* nisu detaljno obrađene prema dostupnoj literaturi.

1.1.3 Rod *Phlomis* L.

Rod *Phlomis* pripada porodici Lamiaceae. Obuhvata višegodišnje zeljaste biljke, polužbunove i žbunove. Stablo je visoko, može imati više cvetova, zbliženih ili odvojenih, dok su listovi naborani. Cvetovi su složeni u dihajije, koje su grupisane u prividne pršljenove. Čašica je cevastog ili zvonastog oblika, sa 5 čašičnih zubaca, dok je krunica dvousnata, žuta ili crvena (ređe bela); gornja usna je u obliku šlema, bočno jako spljoštena, srpasta, dok je donja proširena i podeljena u 3 režnja. Prašnici (ukupno 4) se paralelno izdižu ispod gornje usne krunice, dok su plodići trouglasti, većinom goli [16,17].

Ovaj rod obuhvata oko 65 vrsta, od kojih je većina rasprostranjena u Mediteranu i na Orijentu, dok se neke javljaju i u Aziji (Indija i Kina). U Srbiji je zastupljena samo jedna vrsta: *Phlomis tuberosa* L [16].

1.1.3.1 *Phlomis fruticosa* L. (Lamiaceae) – grmolika gostanka

1.1.3.1.1 Makroskopske karakteristike *P. fruticosa*

Vrstu *P. fruticosa* (Slika 6) čine višegodišnje, zeljaste biljke ili polužbunovi i žbunovi. Stablo dostiže visinu ~150 cm, i na površini ima formirane trihome. Gornji listovi su dužine 3-9 cm, eliptičnog ili lanceolatnog oblika, odvojeni ili povezani u osnovi. Brakteole su dimenzija 10-20 x 3-7 mm, oble, oblo-lanceolatne ili eliptične, prave pri vrhu, sa trihomama dužine 2-3 mm. Cvetovi su složeni u dihajijume, i grupisani u prividne pršljenove (6-14-36). Čašica je 10-19 mm, a krunica dvousnata, 23-35 mm, žute boje. Gornja usna krunice je u obliku šlema, bočno jako spljoštena, srpasta, dok je donja proširena, deljena u tri režnja [16]. Plod je orašica, koja može biti sa ili bez dlaka. Predstavnici ove vrste su široko rasprostranjeni u Mediteranskom regionu, od Sardinije (Albanija, Krit, Grčka, Italija, primorski deo Crne Gore, Sardinija, Sicilija) do Azije (Anatolija, Turska) [18].



Slika 6. Cvet *Phlomis fruticosa*
(preuzeto sa interneta)

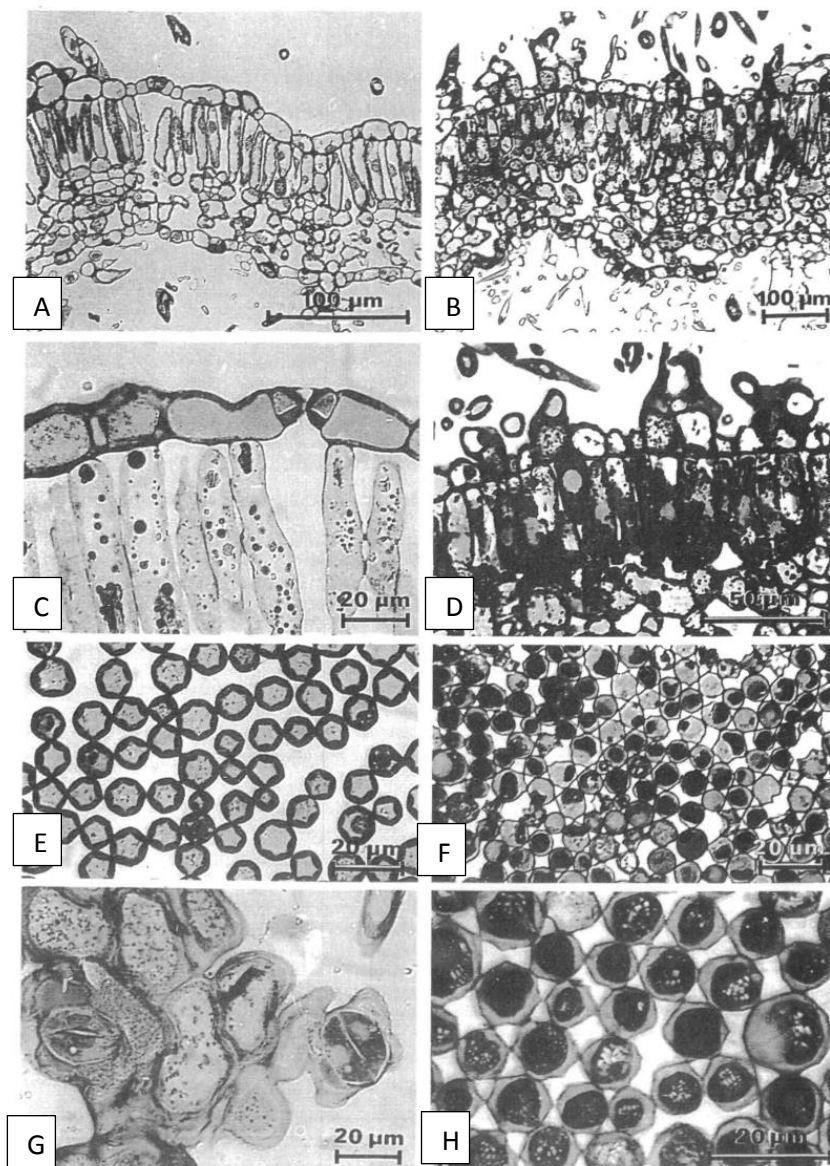
1.1.3.1.2 Histo-anatomske karakteristike *P. fruticosa*

Karakteristike zimskog i letnjeg lista. Istraživanja strukture lista pokazala su značajne razlike između zimskog i letnjeg lista (sezonski dimorfizam). Letnji list je pokriven gusto raspoređenim dlakama, tanji je i kompaktniji u poređenju sa zimskim (**Slika 7A, B**). Mezofil akumulira osmiofilna jedinjenja u ćelijama letnjih listova (**Slika 7B, D, F**), koja su histohemijski identifikovana kao fenoli. Fenoli i kristali (**Slika 7H**) se često javljaju u listovima kserofita [19], što je uobičajeno kod mediteranskih biljaka [20]. Izostanak tih vakuolarnih inkluzija iz ćelija mezofila zimskog lista (**Slika 7A, E**) pokazatelj je stanja bez stresa tokom zimskih meseci, iako se ponekad fenolne globule mogu pojaviti u nekim listovima na kraju zime (**Slika 7C**) [20].

Hloroplasti su na površinskom preseku [21] daleko brojniji u mezofilnim ćelijama zimskih listova (**Slika 7E**) u poređenju sa letnjim listovima (**Slika 7 F, H**), gde su hloroplasti zapaženi u manjem broju i manje su razvijeni.

Poprečni i uzdužni preseci listova su pokazali da se stome mogu primetiti na epidermisu naličja i ređe na epidermisu lica zimskih listova (**Slika 7C, G**). Prisustvo stoma na gornjoj površini čini se kontradiktornim činjenici da su mnoge kserofitne biljke zaštićene od gubitka vode posedujući, između ostalog, hipostomatične listove [19]. Posmatranje brojnih preparata letnjih listova nije pokazalo ni jednu stomu na epidermisu lica lista. Ova neobična varijacija može značiti da karakteristika koja štiti od letnje suše

može biti nepovoljna tokom zime, tako da je sezonski dimorfizam listova strategija za iskorištavanje i prevazilaženje obe situacije [20].



Slika 7. A i B, preseki zimskog i letnjeg lista. C, fragment epidermisa lica zimskog lista. Prikazane su ćelije stome. Male fenolne globule prisutne su u vakuolama palisadnih ćelija. D, fragment epidermisa i palisadnog tkiva u letnjem listu. E i F, iseći paraderma kroz palisadno tkivo u zimskim i letnjim listovima. G, stoma na gornjoj površini zimskog lista. H, fragment palisadnog tkiva u letnjem listu (uzdužni presek) [20].

Anatomske karakteristike stabla i korena. U **Tabeli 1** su prikazane kvantitativne anatomske karakteristike stabla i korena *P. fruticosa*. Stablo je difuzno-porozno, dok su provodni sudovi obično raspoređeni u tangencijalnim trakama. Sitasti elementi su sa kosim jednostavnim perforiranim sitastim pločama. Vlakanste ćelije su tankih do debelih zidova, neperforirane, s jednostavnim jamicama, dok aksijalni parenhim odsustvuje. Zraci su uni-do triserijatni, homocelularni s kvadratnim ćelijama i jednim redom uspravnih ćelija [22].

Koren je difuzno-porozan, a provodni sudovi najčešće pojedinačni. Sitasti elementi su sa kosim jednostavnim perforiranim pločama i nazimničnim jamicama između sudova. Vlaknaste ćelije su tankih do debelih zidova, bez pregrada. Aksijalni parenhim odsustvuje. Zraci su uni- do triserijatni, homocelularni s kvadratnim ćelijama i jednim redom uspravnih ćelija [22].

Tabela 1. Anatomske karakteristike stabla i korena *Phlomis fruticosa* [22].

	Stablo	Koren
Provodni sudovi po mm²	93,7 ± 8,6 (80–105)	94,2 ± 7,1 (82–104)
Dijametar provodnih sudova (µm)	27,01 ± 6,33 (15– 40)	51,52 ± 11,39 (30–90)
Dužina provodnih sudova (µm)	233 ± 28 (175–310)	260 ± 31 (150–350)
Broj sudova po grupi	5 (1–9)	2 (1– 4)
Veličina jamica (µm)	4	5
Dužina vlaknastih ćelija (µm)	590 ± 75 (390–700)	620 ± 81 (410–740)
Visina zraka (µm)	370 ± 30 (150–600)	400 ± 34 (150–680)
Širina multiserijatnog zraka (µm)	35 ± 4	35 ± 5
Širina uniserijatnog zraka (µm)	–	10 ± 2
Broj zrakova po mm	12 ± 2	18 ± 2

Pokazano je da su anatomske karakteristike korena i stabla *P. fruticosa* slične onima kod pustinjačkih biljaka [23,24], što ukazuje na adaptacije na sušne mediteranske uslove [22].

1.2 Etnobotanička upotreba ispitivanih vrsta

1.2.1 Etnobotanička upotreba biljaka iz roda *Anthriscus*

Rod *Anthriscus* (krbuljice) čine biljke iz porodice Apiaceae. Ovaj rod obuhvata 12 vrsta, od kojih se neke smatraju korovskim. Tokom istorije, krbuljice su se koristile zbog nekoliko lekovitih svojstava: kao diuretik, sredstvo za iskašljavanje, poboljšanje probave i za osvežavanje kože. Smatralo se i da preparati pripremljeni od krbuljice ublažavaju simptome ekcema, gihta, bubrežnih kamenaca i pleuritisa, kao i da se mogu efikasno koristiti za ispiranje očiju. Listovi i koren su našli primenu i u kulinarstvu, dok se mladi listovi *A. cerefolium* koriste u tonicima već hiljadama godina [6,7]. Danas, *A. cerefolium* je najpoznatiji kao lek za povišeni krvni pritisak.

1.2.2 Etnobotanička upotreba biljaka iz roda *Ononis*

Rod *Ononis* je među Grcima poznat još od Dioskorida koji je opisao vrste ovog roda efikasnim kod poboljšanja raspoloženja, dok Plinije preporučuje njihovu upotrebu kod kamena u pljuvačnim žlezdama. Za Matiola ove biljke leče urolitijazu, edeme, žuticu itd. Češka škola takođe koristi ove biljke za reumu i odontalgiju još od 16. veka [25]. Neke vrste iz roda *Ononis* su jestive, a mladi izdanci se koriste za kuvanje [8]. Koren je takođe jestiv i žvače se zbog ukusa sličnog sladiću, a sirovi cvetovi se koriste kao ukras za salatu [26]. Vrsta *Ononis spinosa* L. se koristi u narodnoj medicini za lečenje urinarnih oboljenja, dok se može koristiti i površinski za zaceljivanje rana, ekcema i dr. Koren zečjeg trna (*Ononidis radix*) u kombinaciji s drugim lekovima, prodaje se u obliku raznih preparata kao diuretiki i antidijabetički agens [25]. Nadzemni delovi *O. arvensis* L. koriste se u tradicionalnoj medicini za lečenje infekcija mokraćnog sistema i kožnih bolesti. U jordanskoj narodnoj medicini nadzemni delovi *O. sicula* Desf. i *O. hirta* L. upotrebljavaju se za ublažavanje štetnih efekata prouzrokovanih karcinomom kože, kao i za lečenje lezija različitog tipa [27].

1.2.3 Etnobotanička upotreba biljaka iz roda *Phlomis*

Vrste roda *Phlomis* imaju široku primenu u etnobotanici, i gotovo svi delovi biljke su visoko vrednovani: listovi (*P. aspera*, *P. cephalotes*), cvetovi (*P. aspera*, *P. rotata*), seme (*P. cephalotes*) i koren (*P. nepetaefolia*). Koriste se u različitim oblicima u lekovite svrhe, kao dekukti, infuzije ili kao sokovi. U obliku dekokta/infuzije se koriste za lečenje želudačnih i stomaćnih poremećaja, zatim u prevenciji različitih patoloških stanja bubrega, srca, vena i kostiju. Neke vrste roda *Phlomis* koriste se za ublažavanje simptoma kašlja i prehlade, poput *P. cephalotes* i *P. plukenettii*. Ostale vrste poput *P. bovei* subsp. *bovei*, *P. crinita*, *P. crinita* subsp. *crinita* i subsp. *mauritanica* koriste se kao obloge za lečenje opekotina, kožnih infekcija i alergija na Mediteranu. Međutim, iste vrste mogu imati različitu primenu zavisno od geografskog podneblja. Tako, u Italiji *P. fruticosa* se koristi kao sredstvo protiv kašlja, dok u Turskoj i Grčkoj ima tradicionalnu primenu za lečenje čira na želucu [11]. Nadzemni deo biljke je sastavni deo i višekomponentnog biljnog čaja "Zahraa" u Siriji – ovo je složena mešavina listova i/ili cvetova oko 14 vrsta, uključujući *P. syriaca* [28]. U Portugalu, biljna mešavina poznata i kao Marioila, u čiji sastav ulazi *P. purpurea*, koristi se za lečenje bolova u želucu, kao spazmolitik itd. [29]. U Španiji *P. purpurea* se naziva

"matagallos", a infuzija pripremljena iz nadzemnih delova biljke se često koristi za lečenje bolesti prostate i jetre [30]. Vrsta *P. lychnitis*, nazvana Kandilera, takođe se koristi u Španiji kao tonik, sedativ i adstringens za lečenje stomačnih problema [31–33].

Vrste roda *Phlomis* imaju primenu i u kulinarstvu – npr. cvetovi nekih vrsta (*P. purpurea* subsp. *purpurea*, *P. cephalotes*) se konzumiraju sveži, dok se listovi *P. cephalotes* i *P. fruticosa* koriste za pripremu sosa u Italiji [9].

1.3 Antimikrobna, antioksidativna i anti-inflamatorna aktivnost vrsta rodova *Anthriscus*, *Ononis* i *Phlomis*

1.3.1 Antimikrobna aktivnost

Početak XX veka smatra se revolucionarnom epohom u medicini zbog, između ostalog, pronalaska lekova sa antimikrobnim delovanjem – antibiotika, koji su znatno produžili životni vek ljudi i smanjili stopu smrtnosti uzrokovanu zaraznim bolestima [34]. Međutim, tokom više decenija usled njihove neadekvatne upotrebe pri lečenju infekcija ljudi, terapijska efikasnost mnogih antibiotika je danas umnogome smanjena. Ovome je znatno doprinela i njihova prekomerna preventivna primena u veterini i poljoprivredi, kao i privremeni zastoj u razvoju novih, efikasnih i sigurnih antimikrobnih agenasa [35]. Primer za to je neefikasnost penicilina usled pojave bakterija rezistentnih na ovaj antibiotik. Naime, nakon otkrića i intenzivne upotrebe penicilina, pojavile su se stafilokoke rezistentne na ovaj antimikrobni agens; nakon toga je uveden je meticilin – derivat penicilina, a nedugo zatim identifikovan je *Staphylococcus aureus* otporan i na ovaj agens (meticilin-rezistentan *Staphylococcus aureus* – MRSA) [36]. Danas je MRSA soj rezistentan na čitavu klasu antibiotika usled sposobnosti da formira varijante otporne na više antimikrobnih lekova. Ovi, često nazivani „super otporni sojevi“ se dovode u vezu sa povećanom smrtnošću obolelih, jer medicina raspolaže ograničenim brojem terapijskih sredstava kojima se oni mogu iskoreniti [34].

Lečenje oboljenja uzrokovanih patogenim mikrogljivama je danas veoma složeno a broj dostupnih, efikasnih i sigurnih lekova je ograničen. Naime, ovo je posledica toga što ljudi i gljive dele istu ćelijsku građu ćelije – eukariotsku, pa samim tim i neke molekularne procese. Imajući to u vidu, uvek postoji rizik da lekovi koji se primenjuju za tretman gljivičnih infekcija imaju neželjene toksične efekte i za ćelije domaćina, odnosno korisnika tog agensa. Stoga je njihova sistemska primena svedena samo na one slučajeve u kojima korist od primene leka prevazilazi potencijalne rizike za zdravlje i najčešće se koriste lekovita sredstva sa topikalnom primenom u kojima je sistemska apsorpcija i cirkulacija ograničena [37,38]. Kao što je to slučaj sa bakterijama, i patogene mikrogljive mogu razviti različite mehanizme rezistencije na delovanje lekova, što otežava lečenje bolesti, a nepravilna i prekomerna upotreba fungicida u poljoprivredi može takođe dovesti do rezistencije i pojave klinički važnih patogena. Ova pojava zabeležena je pri tretmanu aspergiloze, oboljenja prouzrokovanog vrstom *Aspergillus fumigatus*, komercijalnim medikamentom azolom. Naime, budući da su osobe s dijagnostifikovanom aspergilozom razvile rezistenciju na azol, iako nikada nisu lečene njime, pretpostavlja se da je ovaj fenomen kod vrste *A. fumigatus* nastao zbog pogrešne i prekomerne upotrebe azola na usevima koji su kasnije korišćeni u ishrani [39].

Zbog svega navedenog, broj antifungalnih lekova koji su efikasni i sigurni za upotrebu na tržištu je znatno manji u odnosu na broj lekova sa antibakterijskim efektom. Istorijski gledano, Amfotericin B je bio jedini dostupan lek širokog spektra antifungalnog delovanja gotovo 30 godina, a glavnim napretkom u razvoju antifungalnih agenasa se smatra otkriće imidazola i triazola krajem 1980-ih i ranih 1990-ih godina, kada je i učinjen najveći napredak u otkrivanju antifungalnih agenasa. Pa ipak, sa povećanim brojem efikasnih antifungalnih lekova, povećavao se i broj vrsta gljiva sa novorazvijenim mehanizmima rezistencije na njih, što je dovelo gotovo do povratka na početnu tačku u borbi sa patogenim mikrogljivama [40]. Rezistencija na antifungalna sredstva kao i recidivi infekcija su postali svakodnevnica, naročito sa porastom broja imunokompromitovanih

pacijenata (AIDS, dijabetes, pacijenti sa transplantiranim organima i dr.) kod kojih je uočen i trend porasta učestalosti sistemskih fungalnih infekcija [38,40,41].

Imajući sve navedeno u vidu, savremeno doba se s pravom može nazvati dobom svetske zdravstvene krize, jer kako sa jedne strane postoji porast broja obolelih od infektivnih oboljenja, tako sa druge postoje i ograničenja u njihovom lečenju nedovoljno efikasnim medikamentima. Stručnjaci već godinama upozoravaju da se približavamo tzv. post-antibiotskoj eri - vremenu kada postojeći antibiotici (u širem smislu se odnosi na sve antimikrobne agense) postaju nedelotvorni na uzročnika oboljenja zbog kog se primenjuju. Zbog toga je neophodno kontinuirano ulaganje finansijskih sredstava i naučnih resursa sa ciljem formulisanja novih, efikasnih i sigurnih terapeutika sa antimikrobnim delovanjem. Kao jedno od mogućih rešenja novonastalog problema, navodi se i hemijska modifikacija već postojećih lekova na tržištu, ali i proučavanje jedinjenja prirodnog porekla sa potencijalnim antimikrobnim delovanjem, što je svojevrsni trend u nauci poslednjih decenija. Na ovo ukazuje niz objavljenih naučnih studija u kojima je pokazano da su prirodne supstance izuzetno efikasne u inhibiranju rasta različitih patogenih mikroorganizama [42].

Literaturni podaci ukazuju da različiti delovi biljaka roda *Anthriscus* mogu pokazati antimikrobnu aktivnost. Tako, Lai i saradnici [43] su pokazali da etarsko ulje izolovano iz nadzemnih delova *Anthriscus caucalis* M. Bieb deluje inhibitorno na rast bakterija *Bacillus subtilis* i *Escherichia coli* (minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) = 0,095 mg/mL i 0,105 mg/mL, redom). Takođe, etarsko ulje dobijeno iz korena *A. nemorosa* (Bieb.) Sprengel ima značajnu antibakterijsku (*Staphylococcus epidermidis*, *B. subtilis* i *E. coli*) i antifungalnu (*Candida albicans*) aktivnost [44]. Istraživanja su pokazala da i različiti ekstrakti mogu biti efikasni antimikrobni agensi [45–50].

Kada je u pitanju antimikrobni potencijal vrsta roda *Ononis*, pokazano je da vodeni ekstrakt nadzemnih delova biljke *O. spinosa* inhibira rast kolonija *Listeria monocytogenes* i *L. ivanovii* (MIK = 12,5 µg/mL, odnosno 50 µg/mL, redom), dok je infuzija dobijena iz korena *O. spinosa* pokazala baktericidno delovanje u opsegu 8-128 µg/mL na sledeće patogene sojeve: *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* i *Mycobacterium tuberculosis* [51]. Vodeni ekstrakti biljaka *O. sessilifolia* Bornm., *O. basiadnata* Hub. & Mor. i *O. macrosperma* Hub. & Mor. nisu pokazali antimikrobnu aktivnost, dok su *n*-butanolni i etanolni ekstrakti istih vrsta umereno inhibirali rast testiranih patogenih mikroorganizama [52]. Pored toga, *n*-heksanski i acetonski ekstrakti *Ononis pubescens* su pokazali visok antibakterijski potencijal prema *Staphylococcus aureus* [53], dok su različiti ekstrakti herbe *Ononis arvensis* inhibitorno delovali na rast *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium* i *Staphylococcus aureus* [54]. Visok antibakterijski potencijal na vrste roda *Staphylococcus*, pokazali su i metanolni i etil acetatni ekstrakti *Ononis natrix* subsp. *hispanica* [55]. Što se tiče antifungalnog potencijala (minimalna inhibitorna/minimalna fungicidna koncentracija) vrsta roda *Ononis*, literaturni podaci su pokazali da infuzija pripremljena od *Ononidis Radix* deluje protiv sledećih vrsta patogenih mikrogljiva: *Candida albicans* (MIK 0,016 mg/mL; MFK 0,064 mg/mL), *C. tropicalis* (MIK 0,016 mg/mL; minimalna fungicidna koncentracija (MFK) 0,064 mg/mL), *C. parapsilosis* (MIK 0,008 mg/mL; MFK 0,016 mg/mL), *Trichophyton rubrum* (MIK 0,016 mg/mL; MFK nije određen), *Epidermophyton floccosum* (MIK 0,066 mg/mL; MFK nije određen) i *Microsporum gypseum* (MIK 0,032 mg/mL; MFK nije

određen), što može imati praktičan značaj u lečenju kandidijaze, naročito u slučaju *C. parapsilosis* [56].

Kada je u pitanju antimikrobni potencijal vrsta roda *Phlomis*, etarska ulja različitih vrsta pokazala su značajan antibakterijski efekat protiv širokog spektra patogenih sojeva pri čemu su se *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa* pokazale najosetljivijim na njihovo dejstvo [11]. Pored etarskih ulja, metanolni ekstrakti *P. bruguieri*, *P. herba-venti*, *P. olivieri* su takođe inhibirali rast *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *S. sanguis* i *Pseudomonas aeruginosa* [57,58]. Što se tiče antifungalne aktivnosti vrsta roda *Phlomis*, etarska ulja različitih pripadnika su pokazala antifungalni potencijal, delujući inhibitorno na različite vrste patogenih mikromiceta. Tako, Demirci i saradnici [59] navode da ulja *Phlomis russeliana* i *P. grandiflora* deluju inhibitorno na rast čestog uzročnika trovanja hranom *Clostridium perfringens*. Dalje, ulja su se pokazala efikasnim u inhibiciji rasta klinički relevantnih sojeva *Candida* spp., dok su metanolni ekstrakti *P. bruguieri*, *P. herba-venti* i *P. olivieri* sprečili rast vrste *Aspergillus niger*, poznatog proizvođača mikotoksina, što može imati praktični značaj u industriji hrane i poljoprivredi [57,58]. Pored metanolnog, etanolni ekstrakt *P. fruticosa* je delovao i protiv *Aspergillus ochraceus*, *Cladosporium caladosporioides* i *Phomopsis helianthi*; za razliku od ekstrakata, etarsko ulje *P. fruticosa* nije imalo efekta na rast *A. ochraceus*, već samo na poslednje dve pomenute vrste mikromiceta [60], što ukazuje da različita jedinjenja prisutna u ekstraktima/uljima mogu imati antimikrobni potencijal. Lopez i saradnici [61] su pokazali da nepolarni ekstrakti pripremljeni od biljke *Phlomis lychinitis* imaju antifungalno dejstvo na vrste roda *Rhizopus*, što može biti važno u tretmanu pacijenata, naročito imunokompromitovanih, koji najčešće i boluju od infekcije uzrokovane ovom patogenom vrstom.

1.3.2 Antioksidativna aktivnost

Svi organizmi funkcionišu zahvaljujući energiji koju proizvode u različitim metaboličkim procesima [62]. Reakcija oksidacije koja je presudna za ove procese je zapravo i reakcija tokom koje se proizvode reaktivni molekuli – slobodni radikali koji imaju štetne efekte po strukturu ćelije u kojoj se proces i odvija [62]. Ovi reaktivni molekuli se dele u tri grupe, u zavisnosti od kog molekula nastaju, pa tako razlikujemo: (i) reaktivne molekule kiseonika (nastaju tokom metabolizma kiseonika), (ii) reaktivne molekule azota (nastaju tokom metabolizma azota) i (iii) reaktivne molekule sumpora (nastaju tokom metabolizma sumpora), odnosno skraćeno RKV (reaktivne kiseonične vrste), RAV (reaktivne azotne vrste) i RSV (reaktivne sumporne vrste), redom [63]. Pored ćelijskog metabolizma, slobodne radikalske vrste mogu nastati i pod uticajem različitih egzogenih faktora, kao što su konzumiranje alkohola i duvana, nakon izloženosti pesticidima i drugim štetnim hemikalijama i dr. [64].

Tokom evolucije, biološki sistemi su formirali strategije kojima održavaju balans između produkcije i neutralizacije ovih reaktivnih molekula [63]. Balans se najčešće ostvaruje pomoću enzima (superoksid dismutaza, katalaza) koji umanjuju posledice štetnih efekata koje reaktivne vrste imaju po ćelijske strukture. Međutim, usled izlaganja višestrukim negativnim faktorima (duvanski dim, zagađen vazduh, nepravilna ishrana), koji mogu povećati produkciju slobodnih radikalskih vrsta, posledično dolazi do njihovog nagomilavanja u ćeliji koja zbog toga ulazi u stanje oksidativnog stresa [63,65,66]. Tokom oksidativnog stresa dolazi do ozbiljnog narušavanja metabolizma ćelije, što uključuje i

prekide DNK lanca, povećanje nivoa unutarćelijskog Ca^{2+} , oštećenja membranskih jonskih transportera i/ili drugih specifičnih proteina i lipidne peroksidacije, koji posledično može dovesti do ćelijske smrti mehanizmom apoptoze ili nekroze [67,68]. Proučavanje štetnih efekata koje oksidativni stres ima po ćelijske strukture je od izuzetnog značaja jer se danas zna da je oksidativni stres okidač za razvoj brojnih oboljenja kao što su gastrointestinalna, kardiovaskularna i neurodegenerativna, ali i različite vrste malignih oboljenja [63,69].

Brojni objavljeni podaci ukazuju da su prirodne supstance bogate jedinjenjima koja imaju značajan potencijal u neutralizaciji slobodnih radikalskih vrsta, te se smatraju potencijalnim oruđem u borbi protiv oksidativnog stresa [70–72].

Vrste roda *Anthriscus* su pokazale antioksidativni kapacitet preko različitih mehanizama, što ukazuje na to da se ova aktivnost ostvaruje posredstvom jedinjenja različite hemijske strukture [43,73]. Tako je metanolni ekstrakt dobijen iz nadzemnih delova vrste *A. sylvestris* imao antioksidativni potencijal, a hemijska karakterizacija aktivnih frakcija ekstrakta pokazala je prisustvo luteolin-7-O-glukozida i hlorogene kiseline, koje su označene kao nosioci ove aktivnosti [73]. Takođe, etarsko ulje *A. caucalis* je pokazalo antioksidativnu aktivnost [43]. Sa druge strane, ekstrakt vrste *A. cerefolium* je bio slab antioksidans [74].

Literaturni podaci o antioksidativnom potencijalu vrsta roda *Ononis*, su oskudni. Ergene Öz i saradnici [27] su pokazali da metanolni ekstrakt dobijen iz nadzemnih delova *O. spinosa* subsp. *leiosperma* ima sposobnost neutralizacije slobodnih radikala. Dalje, utvrđeno je da i etanolni ekstrakt (70%) *O. spinosa* inhibira stvaranje superoksidnog anjona uz $\text{IC}_{50} = 1,35 \text{ mg/ml}$, dok je inhibicija lipidne peroksidacije za isti uzorak izostala (IC_{50} vrednost nije određena) [75]. Antioksidativni potencijal je konstatovan i za ekstrakte vrsta *O. natrix*, *O. angustissima* kao i etarsko ulje dobijeno iz *O. sicula* [55,76,77].

Takođe, literaturni podaci o antioksidativnom potencijalu vrsta roda *Phlomis* su oskudni. Poznato je da uzorci metanolnih ekstrakata *P. fruticosa* i *P. lanata* imaju antioksidativno delovanje, jer sprečavaju katalizaciju superoksidacije arahidonske kiseline bleomicin-Fe (II) kompleksom [78]. Takođe, pokazano je da i jedinjenja forzitoid B i akteozid (dva glavna feniletalalkoholna glikozida u rodu *Phlomis*) izolovana iz *P. caucasica* i samiozid izolovan iz *P. samia* imaju sposobnost neutralizacije DPPH radikala [79,80].

1.3.3 Anti-inflamatorna aktivnost

Brojne studije su pokazale da ekstrakti određenih biljnih vrsta poseduju izuzetne anti-inflamatorne sposobnosti, što je od izuzetnog značaja u praksi, jer upalni procesi mogu doprineti razvoju širokog spektra hroničnih oboljenja [81,82].

Biljne vrste koje pripadaju rodovima testiranim u ovoj doktorskoj disertaciji su u različitim studijama pokazale anti-inflamatorni potencijal [83]. Tako je ekstrakt dobijen iz *Anthriscus sylvestris* smanjio nivo citokina Th2 u bronhoalveolarnoj tečnosti pluća, a miševi koji su tretirani ovim ekstraktom su pokazali smanjenu ekspresiju interleukina 6 i interferonskog regulatornog faktora (IRF) 4, uz odgovarajuće smanjenje nivoa azot oksida u plućima astmatičnih miševa [84]. Anti-inflamatorni efekat vodenog ekstrakta listova *A. sylvestris* (AE-ASL), kao i molekularni mehanizmi koji su za to zaslužni su istraženi i u *in vitro* i u *in vivo* uslovima [83]. Dobijeni rezultati su pokazali da je pretretman ovim

ekstraktom značajno inhibirao produkciju azot oksida (NO) i prostaglandina E2 u ćelijama makrofaga miša RAW264.7 indukovanih lipopolisaharidom (LPS), bez znakova citotoksičnosti. Uz to, LPS-indukovana ekspresija iRNK za ciklooksigenaze-2, IL -1 β i IL-6 je smanjena pretretmanom sa AE-ASL na dozno-zavistan način [83].

Što se tiče vrsta roda *Ononis*, dokazano je da metanolni i etilacetatni ekstrakti dobijeni iz korena *O. spinosa* subsp. *leiosperma*, koji se tradicionalno koristi za zarastanje rana, imaju anti-inflamatorni efekat [27]. Naime, testirani ekstrakti inhibiraju inflamaciju za 40,4% (metanolni), odnosno 35,4% (etilacetatni) u testu povećanja kapilarne propustljivosti indukovane sirćetnom kiselinom [27]. Takođe, prema istraživanju Spiegler i saradnika [85], ekstrakt korena *O. spinosa* ima anti-inflamatorno dejstvo koje je ostvareno inhibicijom IL-8, a antiinflamatorni efekat je potvrđen i za druge vrste ovog roda – *O. variegata*, *O. viscosa* subsp. *brevifolia* i *O. natrix* subsp. *natrix*, *O. sessilifolia*, *O. basiadnata* i *O. macrosperma* [27,86].

U slučaju vrsta roda *Phlomis*, anti-inflamatorni potencijal je detektovan kod ćelijske linije humanih mastocita HMC-1 indukovane kalcijumovim jonoforom A23187 i forbol 12-miristatom 13-acetatom. Naime, vodeni ekstrakt dobijen iz korena *P. umbrosa* je pri koncentracijama 0,1 i 1,0 mg/mL inhibirao lučenje faktora nekroze tumora (TNF- α), interleukina 6 i interleukina 1 kod ovih ćelija [87,88].

1.4 Biološki aktivna polifenolna jedinjenja

Poznato je da vrste rodova kojima pripadaju ispitivane vrste, poseduju biološke aktivnosti kao što su antimikrobna, antioksidativna i anti-inflamatorna, što se može dovesti u vezu sa njihovim hemijskim sastavom – pre svega polifenolnim jedinjenjima koje sadrže.

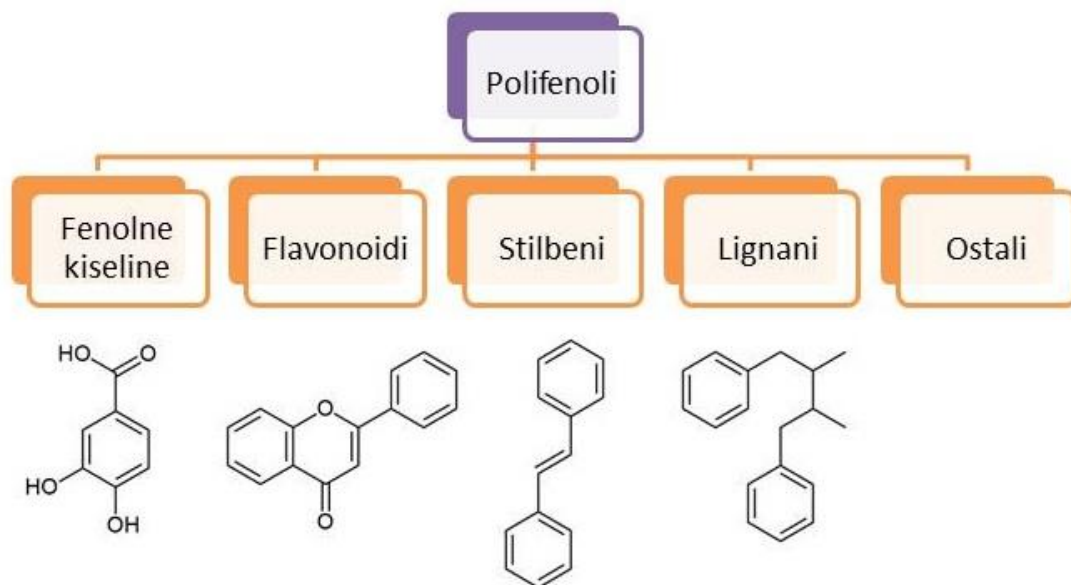
1.4.1 Struktura i klasifikacija polifenolnih jedinjenja

Fenolna jedinjenja čine jednu od najvećih i najrasprostranjenih grupa specijalizovanih metabolita u biljkama [89,90]. Polifenolna jedinjenja obuhvataju različite molekule sa polifenolnom strukturom (tj. nekoliko hidroksilnih grupa na aromatičnim prstenovima), kao i molekule sa jednim fenolnim prstenom, poput fenolnih kiselina i alkohola [89].

Fenolna jedinjenja nastaju kroz dva metabolička puta: (i) put šikiminske kiseline u okviru kojeg se uglavnom formiraju fenilpropanoidi i (ii) put sirćetne kiseline u kojem su glavni proizvodi jednostavni fenoli, a kombinacijom oba puta sintetišu se flavonoidna jedinjenja koja su najšire zastupljena fenolna jedinjenja u prirodi. Fenolna jedinjenja većine biljaka se dalje sintetišu fenilpropanoidnim putem [91]. Ova jedinjenja se smatraju sekundarnim metabolitima, a smatra se da njihov broj premašuje 200.000, što praktično znači da je 1/5 ugljenika fiksiranog fotosintezom usmerena ka fenilpropanoidnom putu [90]. Modifikacijom pomenutih puteva, kroz procese kondenzacije i polimerizacije nastaju kondenzovani – nehidrolizirajući tanini, dok su tanini, koji se mogu hidrolizovati, derivati galne ili heksahidroksidifenske kiseline [92].

Hemijska raznolikost polifenola potiče i od njihove sposobnosti da interaguju sa drugim jedinjenjima, pa tako mogu biti povezani sa ugljenim hidratima (gradeći tako glikozide na različitim položajima polifenolnog skeleta) ili organskim kiselinama, mada se mogu formirati i jedinjenja koja su kombinacija oba [93].

Klasifikacija polifenola prema njihovoj hemijskoj strukturi se zasniva na hemijskoj strukturi aglikona [94]. U okviru ove klasifikacije, polifenolna jedinjenja se mogu klasifikovati na nekoliko načina. Prema ugljenikovom lancu, Harborne [94] je fenolna jedinjenja podelio u 16 glavnih klasa: (1) jednostavni fenoli (skelet C_6), (2) benzohinoni (skelet C_6), (3) fenolne kiseline (skelet C_6-C_1), (4) acetofenoni (skelet C_6-C_2), (5) fenilacetatne kiseline (skelet C_6-C_2), (6) hidroksicimetne kiseline (skelet C_6-C_3), (7) fenilpropeni (skelet C_6-C_3), (8) kumarini i izokumarini (skelet C_6-C_3), (9) hromoni (skelet C_6-C_3), (10) naftohinoni (skelet C_6-C_4), (11) ksantoni (skelet $C_6-C_1-C_6$), (12) stilbeni (skelet $C_6-C_2-C_6$), (13) antrahinoni (skelet $C_6-C_2-C_6$), (14) flavonoidi (skelet $C_6-C_3-C_6$), (15) lignini ($(C_6-C_3)_n$), (16) lignani i neolignani (skelet $(C_6-C_3)_2$). Pored ove klasifikacije, često je korišćena i klasifikacija koja se zasniva na broju fenolnih prstenova kao i strukturnih elemenata koji ove prstenove vezuju jedni za druge. Prema ovom kriterijumu, klasifikacija polifenola obuhvata pet klasa: (1) fenolne kiseline, (2) flavonoidi, (3) stilbeni, (4) lignani i (5) ostali (Slika 7) [95].



Slika 8. Klasifikacija polifenola na osnovu broja fenolnih prstenova koje sadrže i strukturnih elemenata koji ove prstenove vezuju jedni za druge.

1.4.2 Biološka aktivnost polifenola

Veliki broj istraživanja pokazuje da umereno konzumiranje polifenola kroz namirnice može imati pozitivne zdravstvene efekte za korisnika [96]. Naime, unos polifenola može regulisati metabolizam i telesnu težinu, ali i pozitivno uticati na tok hroničnih bolesti, umanjujući njihove štetne efekte [97]. Studije na životinjama i ljudima su pokazale da različiti polifenoli imaju antioksidativni i anti-inflamatorni potencijal, kao i da njihovo konzumiranje može imati preventivni i/ili terapijski efekat kod kardiovaskularnih bolesti, neurodegenerativnih oboljenja, dijabetesa tipa 2, osteoporoze, pankreatitisa, malignih oboljenja i gojaznosti [98,99]. Do danas je identifikovano preko 8000 polifenola, i pored intenzivnih istraživanja, njihovi dugotrajni efekti na zdravlje nisu u potpunosti razjašnjeni [100] (**Tabela 2**). Stoga je neohodan kontrolisan unos ovih jedinjenja imajući u vidu da postoje studije koje su upozorile na štetne efekte koji mogu nastati usled prekomernog konzumiranja polifenola, posebno u slučajevima konzumiranja izolovanih bioaktivnih jedinjenja umesto unosa putem namirnica koje su bogate ovi jedinjenjima [63].

Tabela 2. Potencijalna pozitivna dejstva polifenola na zdravlje ljudi

Tip bolesti	Efekti
Neurodegenerativna oboljenja	<ul style="list-style-type: none"> Kurkumin, resveratrol i katehini (poput epigalokatehin galata) imaju preventivno dejstvo kod demencije i Alchajmerove bolesti; deluju neuroprotektivno i sprečavaju neurotoksične efekte beta-amiloidnog proteina, čija je akumulacija

	<p>povezana sa razvojem Alchajmerove bolesti [101].</p> <ul style="list-style-type: none"> • Poznato je da epigalokatehin galat, kurkumin, miricetin, ginsenzoid pozitivno deluju kod neurodegenerativnih bolesti poput Parkinsonove, Alchajmerove i Hantingtonove bolesti [102]. • Neki polifenoli (kvercetin) deluju na nivou proteina - inhibiraju dejstvo enzima holinesteraze čime mogu delovati pozitivno kod simptoma Alchajmerove bolesti [103].
<p>Inflamacija</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Fenolna jedinjenja mogu sprečiti sistemsku i/ili lokalnu inflamaciju kroz obnavljanje redoks ravnoteže, čime se smanjuju efekti oksidativnog stresa i modulacijom inflamatornih odgovora smanjenjem produkcije citokina [104].
<p>Maligna oboljenja</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Flavonoidi (antocijanini, katehini, flavanoli, flavoni, flavanoni i izoflavoni) mogu neutralisati slobodne radikale i smanjiti rizik od pojave različitih tipova malignih oboljenja zaustavljanjem rasta ćelija [105]. • Dokazano je da polifenoli imaju antitumorsko dejstvo [104,106]
<p>Infekcije</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Različite studije su pokazale da polifenoli, naročito flavonoidi i fenolne kiseline imaju antimikrobni efekat kod širokog spektra mikroorganizama, uključujući patogene bakterije i mikrogljive [107,108].
<p>Kardiovaskularne bolesti</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ishrana bogata flavonoidima dovodi se u vezu sa očuvanjem funkcije srčanih komora, smanjenom aktivnošću trombocita, enzimskom modulacijom, anti-inflamatornim efektima i nižim krvnim pritiskom, što poboljšava sveukupno funkcionisanje kardiovaskularnog sistema [109]. • Eksperimentalno je potvrđeno da flavonoidi i resveratrol mogu blokirati oksidaciju holesterola i smanjuju rizik od pojave kardiovaskularnih bolesti [110].
<p>Dijabetes tip 2</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Upotreba antocijanina je povezana sa prevencijom i regulacijom dijabetesa tipa 2. Ova jedinjenja štite beta ćelije pankreasa od oksidacije, sprečavajući inflamaciju, ali i usporavajući digestiju skroba inhibicijom aktivnosti enzima amilaze i glukozidaze, čime je posledično usporeno oslobađanje glukoze u krv [111].

Gojaznost

- Konzumiranje polifenola poput katehina, resveratrola i kurkumina je dovedeno u vezu sa smanjenjem gojaznosti, koje se postiže brojnim mehanizmima, između ostalog inhibicijom lipogeneze, smanjenjem upale i povećanjem potrošnje energije, što posledično dovodi do gubitka težine [105].
- Pokazano je da određeni broj polifenola ima svojstva vezivanja proteina koja mogu inhibirati razlaganje skroba, lipida i proteina u gastrointestinalnom traktu, što je ostvareno inhibicijom digestivnih enzima [112].

Flavonoidi su jedna od naistraživanijih grupa polifenola u vrstama rodova *Anthriscus*, *Ononis* i *Phlomis*, za koje se pokazalo da poseduju biološku aktivnost.

1.4.3 Flavonoidi kod vrsta rodova *Anthriscus*, *Ononis* i *Phlomis*

Anthriscus je rod koji je vrlo slabo istražen u pogledu hemijskog sastava flavonoida. Rod *Anthriscus* obuhvata mali broj vrsta, tako da su prethodna istraživanja uglavnom fokusirana na flavonoide koji su prisutni kod vrste *A. sylvestris* [113]. Kod *A. sylvestris* su identifikovani kvercetin, apigenin i rutin [113]. Dall'Acqua i saradnici [114] pokazali su da frakcije ove biljke sadrže uglavnom luteolin-7-*O*-glukozid (cinarozid). U drugoj studiji [115] osim kvercetina, rutina i apigenina, identifikovan je flavon kvercetin-3-*O*-glukozid (izokvercetin) i nekoliko izoflavona: daidzin, daidzein, genistin (genistein 7-*O*-glukozid), sisotrin (biochanin A 7-*O*-glukozid) i formononetin. Prethodna istraživanja su pokazala da je dominantan flavonoid u vrsti *A. cerefolium* flavonoid apiin [116].

Mnoge vrste biljaka, uključujući i rod *Ononis* imaju žlezdane trihome koje stvaraju više ili manje lepljive izlučevine, za koje se pokazalo u nekim slučajevima da sadrže i flavonoide [117]. Veliki broj aglikona flavonoida je pronađen u lipofilnom materijalu nakupljenom na nadzemnim delovima biljaka *Ononis fruticosa*, *O. natrix*, *O. tridentata*, *O. rotundifolia*, *O. sicola*, *O. speciosa*, *O. spinosa*, *O. iridentata*, *O. vaginalis* [117]. Identifikovana su sledeća jedinjenja: skutelarein-6,4-di-*O*-metil eter (pektolinarigenin), 5,7,4-trihidroksi-6,8-dimetoksi flavon (desmetilsudahitin), 5,4-dihidroksi-6,7,8-trimetoksi flavon (ksantomikrol), 5,7-dihidroksi-6,8,4-trimetoksi-flavon (nevadensin), 5-hidroksi-6,7,8,4-tetrametoksi-flavon (vrtin B), 5,7-dihidroksi-8,3,4-trimetoksi-flavon (hipolaetin-8,3,4-tri-*O*-metil eter), 5,3,4-trihidroksi-6,7,8 -trimetoksi flavon (sideritiflavon), 5,7,3 -trihidroksi-6,8,4 -trimetoksi flavon (acerozin), 5,4-dihidroksi-6,7,8,3 -tetrametoksi flavon, 5,7-dihidroksi-6,8,3, 4-tetrametoksi flavon (himenoksin) i 5,2, 4-trihidroksi-6,7,8,5 -tetrametoksi flavon (agekorinin D) [117]. Većina flavonoidnih aglikona pronađenih u nadzemnim delovima vrsta roda *Ononis* su flavoni; flavonoli se javljaju samo povremeno. Smatra se da je prisustvo 6- i 6,8-*O*-supstitucije karakteristična osobina flavona i flavonola iz roda *Ononis* [117]. Iako su zabeleženi više ili manje lipofilni aglikoni flavonoida iz korena, stabljike, kore i semena brojnih rodova, pojava eksterno akumuliranih flavonoidnih aglikona je prilično redak fenomen kod familije Fabaceae [117]. Prethodno podaci iz literature otkrili su da su metilovani derivati flavona vrlo česti za vrste roda *Ononis* [117]. Prisustvo

izoflavonoida i njihovih derivata iz grupe pterokarpana i norneolignana [118-120] otkriveno je ranije kod vrsta iz roda *Ononis*. Iz korena *O. angustissima* izolovano je tri izoflavona: 3-(4-(glukopiranoziloksi)-5-hidroksi-2-metoksifenil)-7-hidroksi-4H-hromen-4-on, ononin i formononetin, kao i četiri pterokarpana [118]. Brojne fenolne komponente su izolovane iz korena *O. vaginalis*, među njima pterokarpani [121]. Fitohemijaska ispitivanja nadzemnih delova *O. viscosa* subsp. *breviflora* dovela su do identifikacije pterokarpana prisutnih i kod vrste *O. speciosa* [122]. U korenu *O. spinosa* detektovani su sledeći izoflavonoidi: formononetin, ononin (formononetin 7-*O*-glukozid), pseudobaptigenin glukozid, genistein, biohanin A 7-*O*-glukozid 6"-*O*-malonat, formononetin 7-*O*-glukozid 6"-*O*-malonat, 2,3-dihidro-ononin, tektoridin (tektorigenin 7-*O*-glukozid), trifolirhizin (makiain 7-*O*-glukozid), medikarpin 7-*O*-glukozid, kalikozin, salvigenin i sativanon [119]. Najčešće zastupljeni aglikoni izoflavonoida kod istraživanih vrsta u rodu *Ononis* su formononetin, onogenin, kalikozin i sativanon.

Većina flavonoida identifikovanih u rodu *Phlomis* su flavoni i flavonoli, a često 7- ili 3-glikozilovani [11]. Luteolin 7-*O*-glukozid, hrizoeriol 7-*p*-kumaroilglukozid i hrizoeriol 7-*O*-glukozid čine najčešće glikozilovane flavonoide koji su ispitivani u rodu *Phlomis* [80,123,124]. Kod roda *Phlomis* detektovani su flavonoidni glikozidi 7-*O*-glukozidi, 7-*O*-glukuronidi i 7-rutinozidi apigenina, luteolina i hrizoeriola, flavona vicenina-2 (apigenin 6,8-di-*C*-glukozid) i flavanona, naringenina i eriodiktiola [125,126]. Istraživanja ukazuju da su flavon *p*-kumaroilglikozidi jedinstveni za vrste podfamilije Lamioideae [125,127], dok se njihovo prisustvo ne beleži kod predstavnika podfamilije Nepetoideae u okviru familije Lamiaceae [11]. Unutar podfamilije Lamioideae detektovani su 7-*O*-*p*-kumaroilglikozidi apigenina, koji su rašireniji od odgovarajućih hrizoeriolovih derivata. Međutim, (*E*) stereoizomer hrizoeriola 7-*O*-(3-*p*-kumaroil) glukozida, detektovan je kod *P. integrifolia* [128] i *P. crinita* [129]. Hrizoeriol 7-*O*-(3,6-di-(*E*)-*p*-kumaroil) glukozid i hrizoeriol 7-*O*-*p*-kumaroilglukozid, detektovani su u listovima ili trihomima *P. aurea*, *P. floccosa* [123]. *p*-Kumaroil estri hrizoeriola karakteristični su za rodove unutar podfamilije Lamioideae: *Phlomis*, *Ballota* i *Marrubium*, a donekle i *Stachys*, iako su odgovarajući glikozidi apigenina češći [127].

2 CILJEVI

Upotreba biljaka u lekovite svrhe potiče još od antičkih vremena. U poslednje vreme pokazano je da mnoge biljke poseduju bioaktivna jedinjenja sa antimikrobnim, antioksidantnim, anti-inflamatornim i antitumorskim potencijalom i njihova primena retko izaziva neželjene efekte što ih čini pogodnim za primenu u medicini.

Imajući u vidu sličnu primenu biljaka *Anthriscus cerefolium* (L.) Hoffm (Apiaceae), *Ononis spinosa* L (Fabaceae) i *Phlomis fruticosa* L. (Lamiaceae) u etnobotanici, osnovni cilj ove doktorske disertacije je uporedna analiza biološke aktivnosti i hemijskog sastava ekstrakata ovih biljaka što će doprineti rasvetljavanju njihovog etnobotaničkog značaja i ukazati na njihova potencijalna lekovita svojstva.

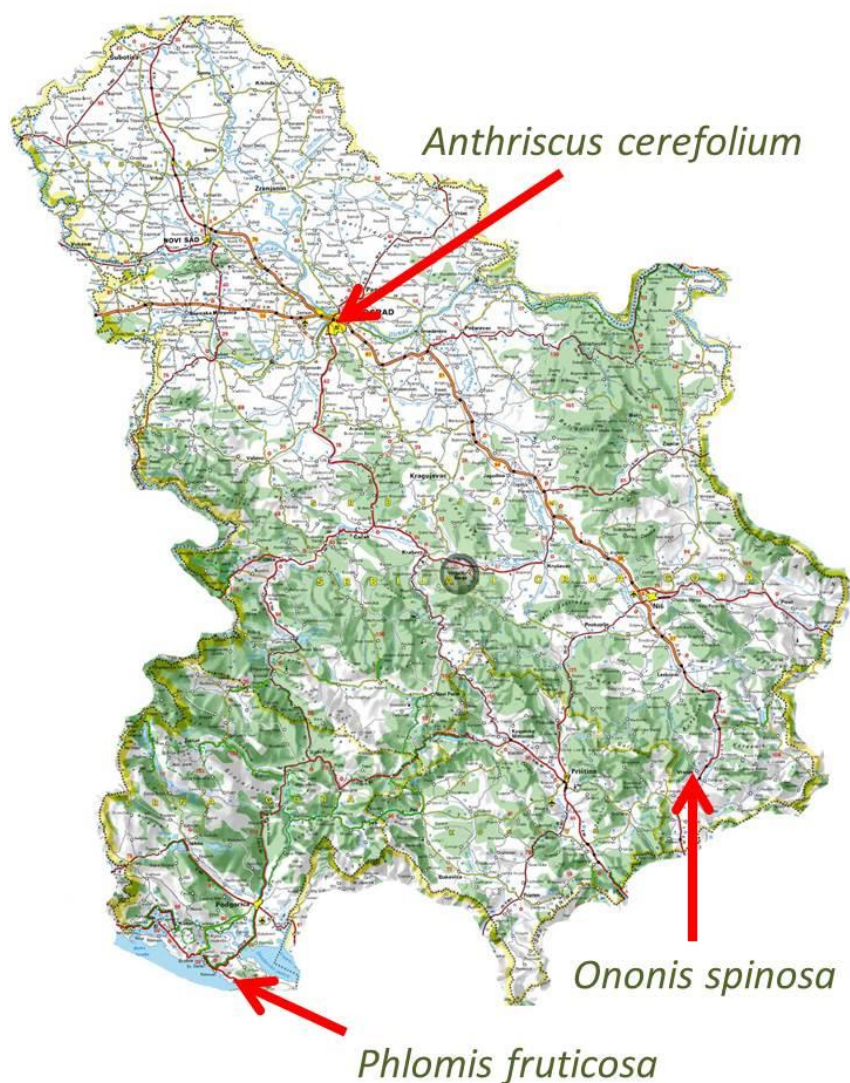
U svrhu utvrđivanja biološke aktivnosti i fitohemijske karakterizacije metanolnih ekstrakata vrsta *A. cerefolium*, *O. spinosa* i *P. fruticosa* definisani su sledeći specifični ciljevi:

- Analiza antibakterijskog i antifungalnog dejstva
- Određivanje potencijalnog mehanizma antimikrobnog delovanja
- Analiza antibiofilm aktivnosti
- Analiza antioksidativnog potencijala
- Određivanje inhibitornih koncentracija metanolnih ekstrakata proučavanih biljaka za enzime povezane sa terapijom dijabetesa i neurodegenerativnih oboljenja
- Analiza antiproliferativnog potencijala
- Analiza anti-inflamatornog potencijala
- Identifikacija i kvantifikacija fenolnih i srodnih jedinjenja upotrebom tečne hromatografije visokih performansi u kombinaciji sa masenom spektrometrijom.

3 MATERIJAL I METODE

3.1 Poreklo biljaka i skladištenje biljnog materijala

Lokaliteti na kojima su prikupljene biljne vrste *Anthriscus cerefolium* (L.) Hoffm. (Apiaceae), *Ononis spinosa* L. (Fabaceae) i *Phlomis fruticosa* L. (Lamiaceae) prikazani su na **Slici 9**. Biljka *A. cerefolium* sakupljena je u Beogradu, Srbija, tokom perioda cvetanja u maju 2018. godine. Nadzemni delovi samonikle biljke *O. spinosa* prikupljeni su u Vranju u julu 2018. godine i identifikovani na osnovu morfoloških karakteristika. Uzorci *O. spinosa* i *A. cerefolium* su liofilizovani (LH Leybold, Lyovac GT2, Frenkendorf), zatim redukovani u fini osušeni prah i do daljih analiza čuvani u eksikatoru zaštićeni od svetlosti. U periodu cvetanja biljke, prikupljeni su nadzemni delovi *P. fruticosa* na lokalitetu u blizini Bara (Crna Gora) 1998. godine. Vrsta je identifikovana u Laboratoriji za taksonomiju Instituta za botaniku Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Osušeni celi nadzemni delovi (nesprašeni) *P. fruticosa* čuvani su u papirnim kesama, zaštićeni od svetlosti i dalje odloženi na tamnom mestu, na sobnoj temperaturi.



Slika 9. Lokaliteti na kojima su prikupljene testirane biljne vrste (slika modifikovana i preuzeta sa interneta)

3.2 Priprema metanolnih ekstrakata

10 g spraćšenog biljnog materijala ekstrahovano je preko noći sa 300 mL metanola (Merck, Nemačka) na -20 °C. Nakon toga, dobijeni ekstrakti su sonifikovani 15 min u ultrazvučnom kupatilu (Bandelin sonorex, Berlin, Nemačka), centrifugirani na 4000 g (Heraeus biofuge stratos centrifuga, Thermo electron corporation, Sjedinjene Ameriĉke DrŹave) i filtrirani kroz "Whatman" papir br. 4. Postupak je ponovljen još dva puta korišćenjem dodatnih 2 x 300 mL metanola, u cilju ponovne ekstrakcije biljnog ostatka. Ekstrakti su zatim upareni na rotacionom vakuum uparivaču (Buchi R-210) na 40 °C do suvog ostatka i skladišteni na 4 °C do dalje upotrebe. Detaljan prikaz ekstrakcione procedure dat je na **Slici 10**.



Slika 10. Shematski prikaz ekstrakcije biljnog materijala

3.3 Ispitivanje biološkog potencijala metanolnih ekstrakata *A. cerefolium*, *O. spinosa* i *P. fruticosa*

Biološki potencijal metanolnih ekstrakata biljaka *A. cerefolium*, *O. spinosa* i *P. fruticosa* je ispitan kroz različite testove za određivanje antimikrobne, antioksidativne, enzim-inhibitorne, antiproliferative i anti-inflamatorne aktivnosti.

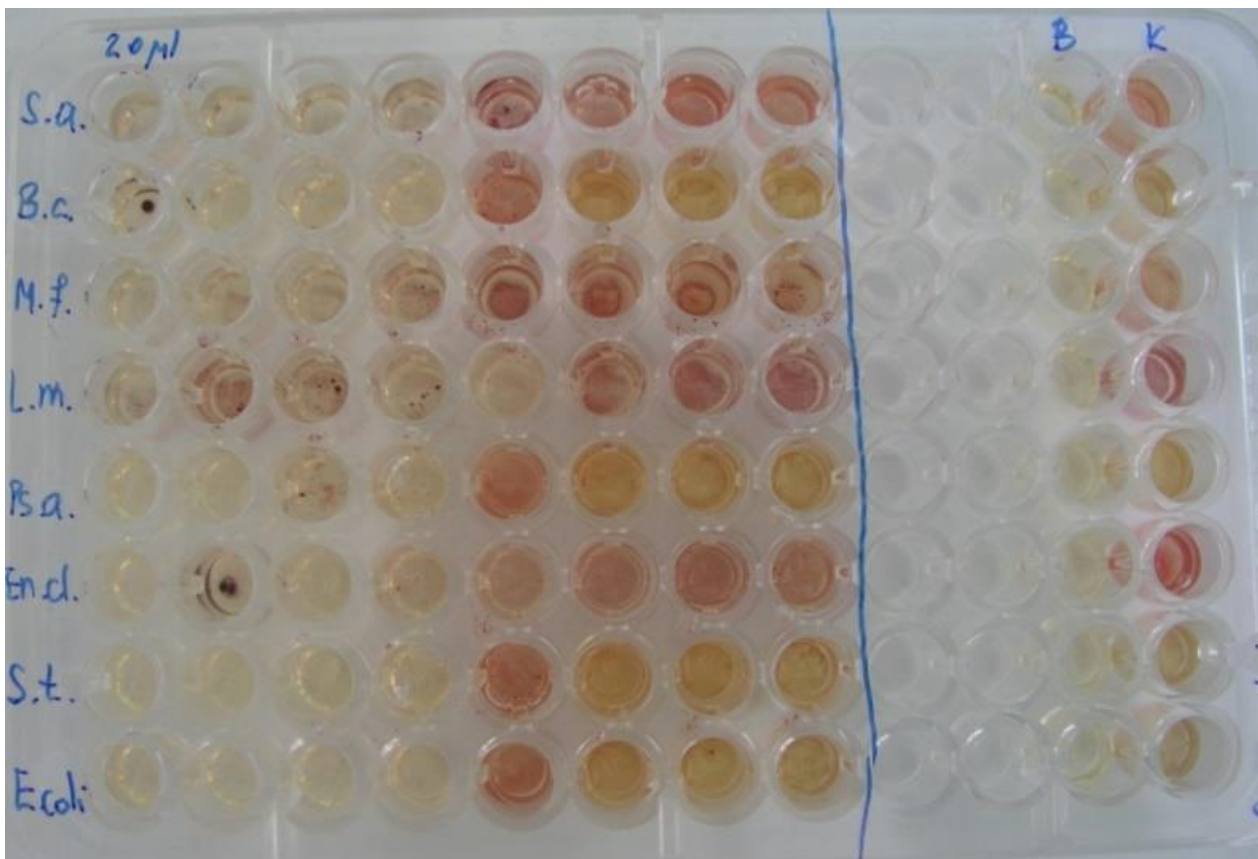
3.3.1 Reagensi

Hemikalije korišćene u testovima za ispitivanje biološke aktivnosti su komercijalno pribavljene od Sigma-Aldrich (Darmstadt, Nemačka): 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina (ABTS), 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), galna kiselina, rutin, kafeinska kiselina, acetilholinesteraza iz električne jegulje (AChE) (tip-VI-S, EC 3.1.1.7), butirilholinesteraza iz seruma konja (BChE) (EC 3.1.1.8), galantamin, acetiltioholin jodid (ATChI), butiriltioholin hlorid (BTChI), 5,5-ditio-bis(2 nitrobenzojeva kiselina) (DTNB), tirozinaza (EC1.14.18.1, iz gljiva), glukozidaza (3.2.1.20, iz *Saccharomyces cerevisiae*), amilaza (3.2.1.1, iz pankreasa svinje), natrijum molibdat, natrijum nitrat, natrijum nitrat - Cioalceu reagens, hlorovodonična kiselina, natrijum hidroksid, troloks, etilendiamintetraacetat (EDTA), neokuproin, bakrov hlorid, amonijum acetat, gvožđe hlorid, 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin (TPTZ), amonijum molibdat, ferozin, gvožđe (II) sulfat heksahidrat, kojična kiselina i akarboza.

3.3.2 Ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata

3.3.2.1 Ispitivanje antibakterijske aktivnosti

Antibakterijska aktivnost ekstrakta je ispitana mikrodilucionom metodom (Institut za kliničke i laboratorijske standarde, CLSI) [130,131] koristeći sledeće sojeve Gram pozitivnih bakterija: *Staphylococcus aureus* (ATCC 11632), meticilin rezistentni *S. aureus* (MRSA izolat) i *Micrococcus luteus* (ATCC 10240), i Gram negativnih bakterija: *Salmonella* Typhimurium (ATCC 13311), *S. Enteritidis* (ATCC 13076), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *E. coli* (rezistentni izolat) i *Enterobacter cloacae* (ATCC 35030). Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) i minimalne baktericidne koncentracije (MBK), korišćena je serijska dilucija u mikrotitarskim pločama (**Slika 11**).



Slika 11. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije i minimalne baktericidne koncentracije primenom mikrodilucione metode

Različite koncentracije metanolnih ekstrakata rastvorenih u 5% dimetilsulfoksidu (DMSO) su dodate u medijum "Tryptic Soy Broth" (TSB) i inkubirane sa bakterijama u koncentraciji od 1×10^6 jedinica koje formiraju kolonije (CFU) u bunarčićima mikrotitarskih ploča. Ploče su inkubirane na 37 °C tokom 24 h, a zatim je dodat rastvor indikatorske INT (*p*-Iodonitrotetrazolium Violet) boje u koncentraciji od 0,2 mg/mL destilovane vode, kako bi se odredile MIK i MBK vrednosti. Najniža koncentracija ekstrakta koji je proizvela značajnu inhibiciju rasta bakterija (~50%) u poređenju sa kontrolnim bunarčićima (obezbeđen neometani rast bakterija) je identifikovana kao MIK, dok je MBK definisana kao najniža koncentracija testiranog ekstrakta, koja je potrebna za potpunu inhibiciju rasta bakterija nakon subkultivisanja tretiranih bakterija. Ampicilin i streptomycin (Panfarma, Beograd, Srbija) su korišćeni kao pozitivne kontrole (0,1-1 mg/mL), dok je 5% DMSO korišćen kao negativna kontrola. MIK i MBK vrednosti su izražene u mg/mL.

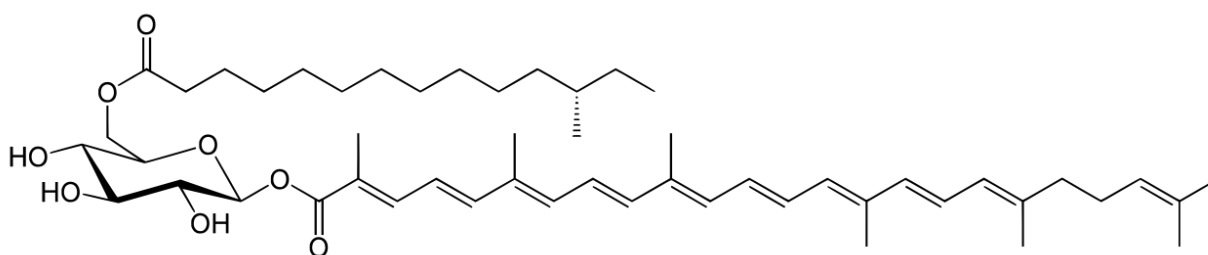
3.3.2.2 Ispitivanje efekta ekstrakata na sposobnost formiranja biofilma *S. aureus*

Efekat različitih koncentracija ekstrakata (u rasponu od 1/32 MIK do 1/2 MIK) na sposobnost formiranja biofilma *S. aureus* je testiran korišćenjem polistirenskih mikrotitarskih ploča sa 96 bunarčića sa ravnim dnom prema metodi Živković i saradnika [132]. Ukratko, 100 µL prekonoćne kulture *S. aureus* (10^8 CFU) je dodato u svaki bunarčić koji je sadržao medijum (100 µL) i 100 µL sub-inhibitornih koncentracija (subMIK)

ekstrakata i/ili 100 μL medijuma (kontrola). Posle inkubacije od 24 h na 37 $^{\circ}\text{C}$, svaki bunarčić je dva puta ispran sterilnim PBS-om (pH 7,4), fiksiran sa 100 μL metanola i osušen; nakon sušenja u bunariće je dodato 100 μL rastvora kristal violeta (0,1%). Nakon 10 minuta boja je isprana sa dH₂O i dodato je 200 μL 95% etanola (v/v) kako bi se rastvorila boja koja se vezala za biofilm. Nakon 10 minuta, apsorbanca je očitavana na Sunrise™ – Tecan ELISA čitaču, na 620 nm. Rezultati su predstavljeni kao procenat inhibicije formiranja biofilma u odnosu na netretiranu kontrolu.

3.3.2.3 Ispitivanje inhibicije produkcije stafiloksantina kod bakterije *S. aureus*

Ispitivanje inhibicije produkcije stafiloksantina (Slika 12) kod *S. aureus* je od izuzetnog značaja imajući u vidu da ovaj pigment svetlo zlatne boje predstavlja i njen faktor virulencije. Ovim testom koji je izveden prema metodi Silve i saradnika [133], kvantifikuje se proizvodnja stafiloksantina pod uticajem različitih koncentracija ispitivanih ekstrakata, u poređenju sa kontrolnim uzorcima u kojima je obezbeđen neometani rast bakterija. Ukratko, metoda se sastoji od sledećeg: ćelije *S. aureus* su inokulisane u TSB medijumu i inkubirane 24 h na 37 $^{\circ}\text{C}$ sa ili bez ekstrakata (1/32 MIK – 1/2 MIK). Zatim su bakterije sakupljene centrifugiranjem (2000 g, Heraeus biofuge stratos centrifuga, Thermo electron corporation, MA, Sjedinjene Američke Države) i dva puta isprane sterilnim fiziološkim rastvorom. Nakon toga je sakupljen talog ćelija kako bi se kvantifikovala proizvodnja stafiloksantina. Za ekstrakciju pigmenta iz taloga, dobijeni materijal je nakon završnog centrifugiranja resuspendovan u 0,2 mL metanola, a zatim je ova smeša zagrevana u vodenom kupatilu na 55 $^{\circ}\text{C}$ tokom 30 min. Nakon isteka vremena, pigment je izdvojen centrifugiranjem na 16.600 g tokom 10 min. Postupak ekstrakcije pigmenta je ponovljen 3 puta kako bi se povećao prinos ekstrahovanog stafiloksantina, a optička gustina je merena na 465 nm pomoću spektrofotometra (Shimadzu UV1601, Japan). Rezultati su predstavljeni kao procenat inhibicije produkcije stafiloksantina u uzorcima tretiranim ekstraktima u poređenju sa netretiranim kontrolnim uzorkom.



Slika 12. Hemijska struktura stafiloksantina

3.3.2.4 Ispitivanje antifungalne aktivnosti

Antifungalna aktivnost ekstrakata određena je metodom serijske mikrodilucije [134], korišćenjem sledećih mikrogljiva: *Aspergillus fumigatus* (ATCC 1022), *A. niger* (ATCC 6275), *A. versicolor* (ATCC 11730), *A. ochraceus* (ATCC12066), *Penicillium funiculosum* (ATCC 8725), *P. ochrochloron* (ATCC 9112), *P. aurantiogriseum* (izolat iz hrane), *Trichoderma*

viride (ATCC 8725), *Candida albicans* (ATCC 10231), *C. tropicalis* (ATCC 750) i *C. krusei* (klinički izolat). Ekstrakti su rastvoreni u 5% dimetilsulfoksidu (DMSO) i serijska razblaženja ekstrakata su dodata u "Malth broth" (MB) medijum za rast gljiva, a zatim je u sadržaj bunarčića mikrotitar ploča dodat inoculum mikrogljiva 1×10^6 CFU. Nakon toga, mikrotitarske ploče su inkubirane na 28 °C u toku 72 h. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) predstavljala je najnižu koncentraciju ekstrakta koja je proizvela značajnu inhibiciju (~50 %) rasta mikrogljiva. Minimalna fungicidna koncentracija (MFK) je određena kao najniža koncentracija ekstrakata koja u potpunosti inhibira rast testiranih mikrogljiva, a određena je reinokulacijom 2 μ L tretiranog uzorka u čist medijum, a zatim ponovnom inkubacijom na 28 °C u toku 72 h. Kao pozitivne kontrole korišćeni su komercijalni fungicidi bifonazol i ketokonazol (0,1-1 mg/mL) (Srbolek, Beograd, Srbija), dok je kao negativna kontrola korišćen DMSO (5% v/v). MIK i MFK vrednosti su izražene u mg/mL.

3.3.2.5 Ispitivanje uticaja ekstrakata na formiran biofilm odabranih *Candida* sojeva

Prekonoćne kulture *C. albicans*, *C. tropicalis* i *C. krusei* su sakupljene iz tečnih kultura i pripremljene za dalji rad u koncentraciji od 1×10^6 ćelija/mL. Biofilm *Candida* sojeva je formiran inkubacijom ovih sojeva u TSB hranljivom medijumu na 37 °C tokom 48 h u mikrotitarskim pločama sa adhezivnim dnom sa 96 bunarčića (Sarstedt, Sjedinjene Američke Države). Nakon isteka vremena, medijum za gajenje je uklonjen, a ploče su isprane tri puta fiziološkim rastvorom kako bi se uklonile ćelije koje nisu adherirale. Različite koncentracije ekstrakata (1-10 mg/mL) u TSB medijumu su dodate u bunarčiće, a zatim su mikrotitarske ploče inkubirane na 37 °C tokom 24 h. Po isteku inkubacije, svaki bunarčić je dva puta ispran sterilnim PBS-om (pH 7,4), fiksiran sa 100 μ L metanola i osušen, a zatim je u svaki bunarčić dodat 0,1% rastvor kristal violeta (100 μ L). Nakon toga ploče su inkubirane u trajanju 10 min na sobnoj temperaturi, isprane sa dH₂O i zatim je u bunarčiće dodato 200 μ L 95% etanola (v/v) kako bi se rastvorila boja koja se vezala za biofilm. Apsorbanca je očitavana na 620 nm na Sunrise™ - Tecan ELISA čitaču [135]. MIKB je definisan kao minimalna koncentracija antimikrobnog agensa koja inhibira dalji rast početnog biofilma, a MFKB je definisana kao koncentracija koja je rezultirala nivoom luminescencije bez rasta gljiva (prazni bunarčić, **Slika 13**). Eksperiment je ponovljen tri puta. Flukonazol (Fluka, Nevsport Nevs, VA, Sjedinjene Američke Države) (1-10 mg/mL) je korišćen kao pozitivna kontrola.



Slika 13. Bojenje formiranog biofilma kristal violetom

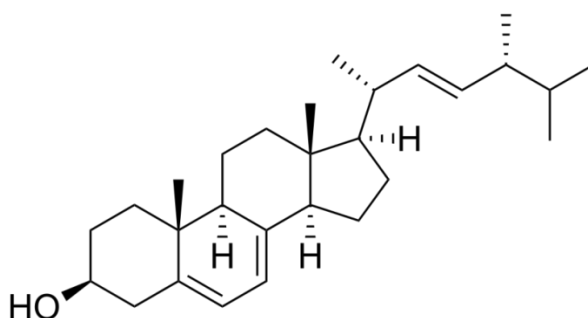
3.3.2.6 Ispitivanje uticaja ekstrakata na integritet ćelijske membrane *C. albicans*

Uticaj ekstrakata na integritet ćelijske membrane *C. albicans* utvrđen je prema ranije opisanoj metodi uz male modifikacije [48]. Prekonočna kultura *C. albicans* je isprana i resuspendovana u 10 mM PBS-u (Phosphate buffered saline, pH 7,4), u koncentraciji od 10^8 ćelija/mL. Tako pripremljene ćelije *C. albicans* su inkubirane sa ekstraktima u MFK koncentraciji koja je određena testom za antifungalnu aktivnost, tokom 0, 15, 30, 45, 60 i 90 min. Kao kontrola korišćena je *C. albicans* inkubirana u 10 mM PBS (pH 7,4), bez dodatka ekstrakata. Nakon svakog vremenskog intervala, a pre određivanja apsorbance, uzorci su propušteni kroz filtere od 0,22 μ m (PSI Lab, Beograd, Srbija) u cilju uklanjanja ćelija testirane mikroglijive. Apsorbanca uzoraka merena je na 260 nm i 280 nm na spektrofotometru (Agilent/HP 8453 UV-Visible Spectrophotometer Agilent Technologies, Sjedinjene Američke Države). Povećanje apsorbance u tretiranim uzorcima u odnosu na kontrolni uzorak (260 nm - nukleinske kiseline i 280 nm - proteini) je bilo indikacija za narušen integritet membrana *C. albicans* i da sadržaj izlazi van ćelija. Kao slepa proba ("blank" uzorci) korišćeni su ekstrakti u MFK koncentraciji rastvoreni u 10 mM PBS-u bez dodatka prekonoćnih kultura *C. albicans*.

3.3.2.7 Ispitivanje uticaja ekstrakata na ergosterol

Ergosterol (Slika 14) je jedan od ključnih molekula koji se nalazi u ćelijskim membranama gljiva. Pošto je to vitalni molekul za opstanak gljiva, enzimi uključeni u njegovu biosintezu često predstavljaju mete za aktivnost efikasnih antimikotika. Uticaj

ekstrakata na ergosterol je analiziran korišćenjem kvasca *C. albicans*, prema ranije opisanoj proceduri [37]. Naime, *C. albicans* je inkubirana u MB medijumu (Torlak, Srbija) u prisustvu serijskih razblaženja ispitivanog ekstrakta i različitih koncentracija ergosterola (25, 50 i 100 $\mu\text{g/mL}$). Vrednosti MFK su određene prema smernicama NCCLS kao što je objašnjeno za antifungalnu aktivnost nakon 24 h prema kontrolnom rastu kvasca i dalje potvrđene nakon 48 h. Ukoliko se MFK ekstrakata povećavala u prisustvu ergosterola, u odnosu na rezultate dobijene pri testiranju antifungalne aktivnosti bez ergosterola, zaključeno je da se antifungalni efekat ekstrakata ostvaruje preko mehanizma u koji je uključen ergosterol.

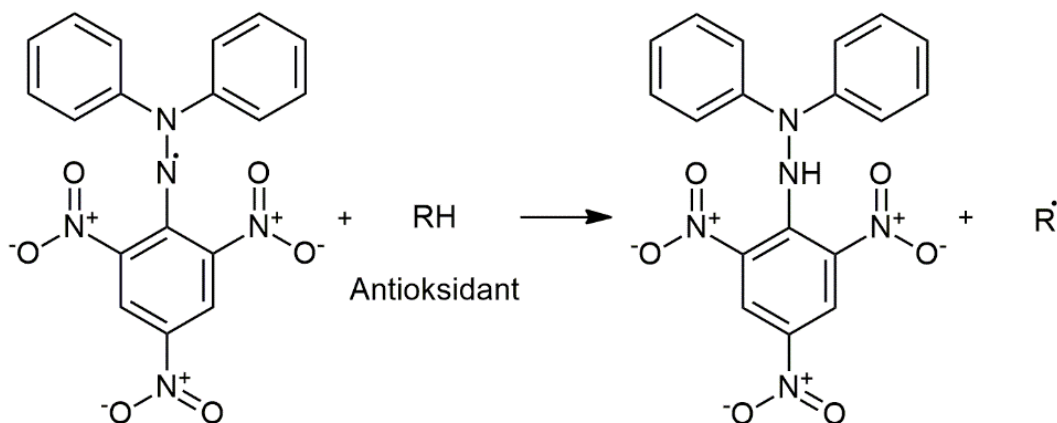


Slika 14. Hemijska struktura ergosterola

3.3.3 Ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata

3.3.3.1 DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) metoda

Antioksidativna aktivnost metanolnih ekstrakata je određena DPPH metodom [136], a princip reakcije ovog testa prikazan je na Slici 15. Ukratko ekstrakti (100 mg/mL) su dodati u 4 mL 0,004% metanolnog rastvora DPPH, a zatim je smeša inkubirana tokom 30 minuta, na sobnoj temperaturi, u mraku. Po isteku vremena, izmerena je apsorbansa na 517 nm, korišćenjem spektrofotometra, a sposobnost neutralizacije DPPH radikala testiranim ekstraktima je izražena u miligramima troloks ekvivalenata (TE) po gramu ekstrakta (mg TE/g ekstrakta).



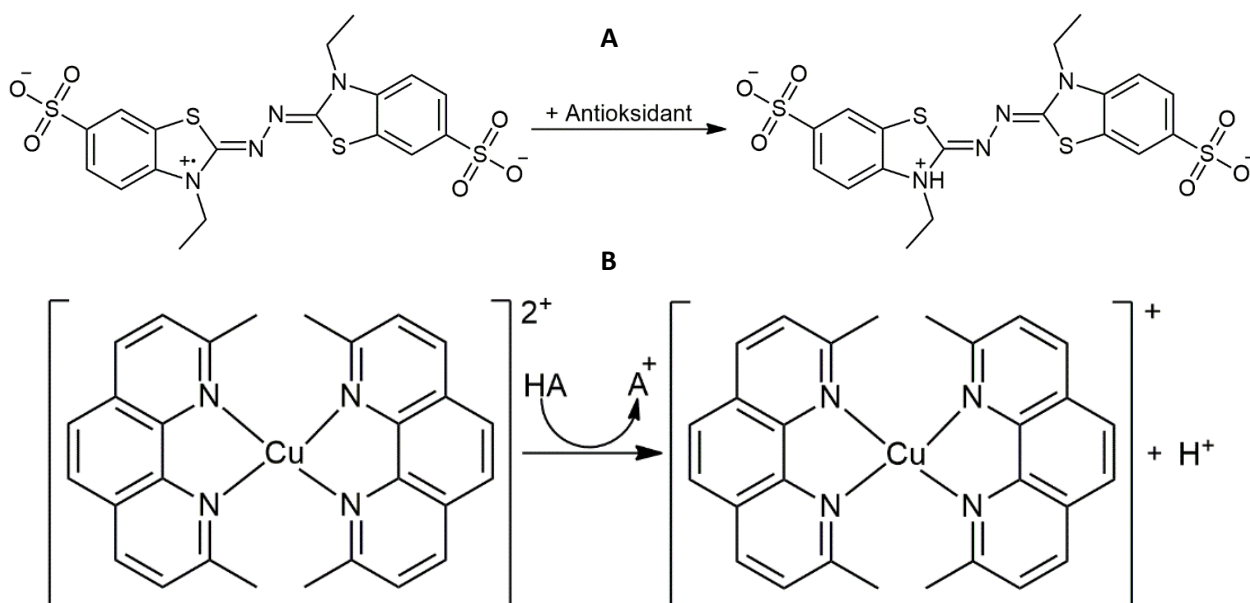
Slika 15. Princip reakcije neutralizacije DPPH radikala

3.3.3.2 ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-sulfonska kiselina) metoda

Antioksidativni potencijal testiranih metanolnih ekstrakata je određen i ABTS⁺ metodom [136]. ABTS⁺ je proizveden reakcijom 7 mM rastvora ABTS sa 2,45 mM kalijum persulfatom, a zatim je smeša ostavljena da stoji 12-16 min u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon toga, ABTS⁺ rastvor je razblažen metanolom do apsorbance od $0,700 \pm 0,02$ na 734 nm. Ekstrakti su dodati u ABTS⁺ rastvor (2 mL) i nakon 30 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi apsorbance uzorka očitavana je na 734 nm. Aktivnost uklanjanja ABTS radikala izražena je u miligramima troloks ekvivalenta po gramu ekstrakta (mg TE/g ekstrakta). Princip reakcije u ovom testu prikazan je na **Slici 16A**.

3.3.3.3 CUPRAC (eng. "cupric ion reducing activity") metoda

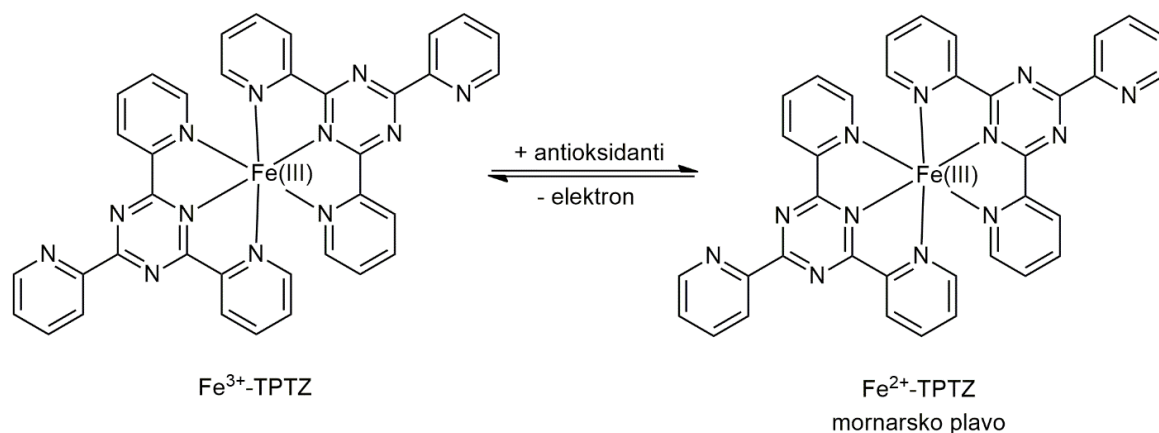
Za CUPRAC test kojim se meri redukujuća sposobnost testiranih ekstrakata, ekstrakti (100 mg/mL) su dodati u reakcionu smešu koja je sadržala: 10 mM CuCl₂ (1 mL), 7,5 mM neokuproin (1 mL) i 1 M NH₄Ac pufer pH 7,0 (1 mL). Slepa proba (eng. "blank") je pripremljena dodavanjem ekstrakata (0,5 mL) u prethodno pripremljenu reakcionu smešu (3 mL) koja nije sadržala CuCl₂. Nakon 30 min inkubacije na sobnoj temperaturi, apsorbance uzoraka i slepe kontrole su očitavane na 450 nm i apsorbance slepe probe je oduzeta od apsorbance smeše sa ekstraktom [136]. Princip reakcije u ovom testu prikazan je na **Slici 16B**, a aktivnost CUPRAC-a je izražena u miligramima TE po gramu ekstrakta (mg TE/g ekstrakta).



Slika 16. A) Princip reakcije neutralizacije ABTS radikala, B) Princip redukcione reakcije u CUPRAC testu

3.3.3.4 FRAP (eng. "ferric reducing antioxidant power") metoda

Sposobnost redukcije gvožđa testiranim ekstraktima je ispitivan prema metodi Uysal i saradnika [136], a reakciona smeša se sastojala od sledećeg: rastvora testiranih uzoraka (100 mg/mL) i FRAP reagensa (2 mL). FRAP reagens je sadržao 0,3 M acetatni pufer pH 3,6, 10 mM 2,4,6-tris(2-piridil)-S-triazina (TPTZ) u 40 mM HCl i 20 mM gvožđe hlorid u odnosu 10:1:1 (v/v/v). Nakon 30 min inkubacije na sobnoj temperaturi, očitavana je apsorbanca na 593 nm. FRAP aktivnost je izražena kao miligram TE po gramu ekstrakta (mg TE/g ekstrakta). Princip reakcije u ovom testu prikazan je na **Slici 17**.

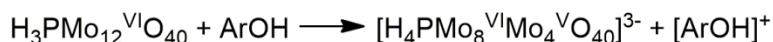
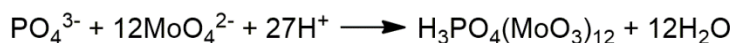


Slika 17. Princip redukcione reakcije u FRAP testu

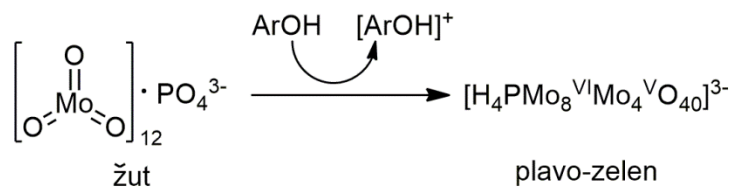
3.3.3.5 Test sa fosfomolibdatom

Test sa fosfomolibdenom je urađen prema metodi Uysal i saradnika [136], a princip reakcije u ovom testu prikazan je na **Slici 18**. Ekstrakt (100 mg/mL) je pomešan sa 3 mL rastvora reagensa koji je sadržao 0,6 M sumpornu kiselinu, 28 mM natrijum fosfat i 4 mM amonijum molibdat. Posle 90 min inkubacije na 95 °C, očitavana je apsorbanca na 695 nm. Ukupni antioksidativni kapacitet izražen je kao milimol troloks ekvivalentata po gramu ekstrakta (mmol TE/g ekstrakta).

hemijske reakcije



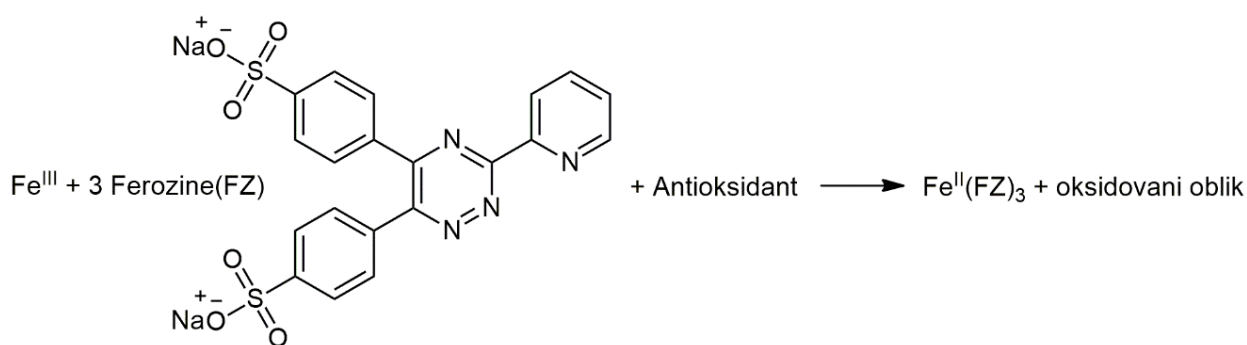
mehanizam reakcije



Slika 18. Princip reakcije u testu sa fosfomolibdatom

3.3.3.6 Test sposobnosti heliranja jona metala

Test sposobnosti heliranja jona metala je urađen prema metodi Uysal i saradnika [136], a princip reakcije u ovom testu prikazan je na **Slici 19**. Ekstrakt (100 mg/mL) je dodat u 2 mM rastvora FeCl_2 (0,05 mL) i reakcija je započeta dodavanjem 0,2 mL 5 mM ferozina. Slepa kontrola (eng. "blank") je pripremljena dodavanjem 2 mL rastvora ekstrakta u 0,05 mL 2 mM FeCl_2 i 0,2 mL H_2O bez ferozina. Nakon 10 min inkubacije na sobnoj temperature, očitavane su apsorbance uzorka i slepe kontrole na 562 nm. Apsorbanca slepe kontrole je oduzeta od apsorbance uzorka. Sposobnost heliranja jona metala je izražena kao miligram EDTA (dinatrijum edetat) ekvivalenata po gramu ekstrakta (mg EDTAE/g ekstrakta).



Slika 19. Princip reakcije heliranja jona metala

3.3.4 Ispitivanje enzim-inhibitorne aktivnosti ekstrakata

Za ispitivanje enzim-inhibitorne aktivnosti su korišćeni enzimi čiji se inhibitori koriste u tretmanu neurodegenerativnih oboljenja (acetilholinesteraza, butirilholinesteraza, tirozinaza) i u tretmanu dijabetesa tipa 2 (*eng.* "diabetes mellitus type 2") (α -amilaza i α -glukozidaza).

3.3.4.1 Inhibicija holinesteraza

Ispitivanje inhibitorne aktivnosti ekstrakta na holinesteraze je urađeno prema metodi Uysal i saradnika [136]. Ekstrakt (100 mg/mL) je pomešan u mikrotitarskoj ploči sa 96 bunarčića sa 125 μ L DTNB (5,5-ditio-bis(2-nitrobenzojeva) kiseline (Sigma, St. Louis, MO, Sjedinjene Američke Države) i 25 μ L AChE (acetilholinesteraza (Electric ell acetilcholinesterase, Tipe-VI-S, EC 3.1.1.7, Sigma)), odnosno 25 μ L BChE (butirilholinesteraza (butirilholinesteraza seruma konja, EC 3.1.8.0 Sigma)) u Tris-HCl puferu pH 8,0, a zatim je smeša inkubirana 15 min na 25 °C. Dodatkom 25 μ L acetiltioholin jodida (ATCI, Sigma) ili 25 μ L butiriltioholin hlorida (BTCl, Sigma) reakcija je započeta. Slepa kontrola je pripremljena dodavanjem ekstrakta u reagens bez dodavanja rastvora enzima (AChE ili BChE). Apsorbance uzoraka i blanka su očitane na 405 nm posle 10 min inkubacije na 25 °C. Apsorbanca slepe kontrole je oduzeta od apsorbance uzorka. Anti-holinesterazna aktivnost je izražena kao miligram ekvivalenata galantamina po gramu ekstrakta (mg GALAE/g ekstrakta).

3.3.4.2 Inhibicija tirozinaze

Ispitivanje inhibitorne aktivnosti ekstrakata na tirozinazu je urađeno prema Uysal i saradnika [136]. Ukratko, u mikrotitarskoj ploči sa 96 bunarčića je pomešan ekstrakt sa 40 μ L rastvora tirozinaze (Sigma) i 100 μ L fosfatnog pufera pH 6,8, a zatim je smeša inkubirana 15 min na 25 °C. Dodatkom 40 μ L L-DOPA (levodopa, Sigma) reakcija je započeta. Slepa kontrola je pripremljena dodavanjem ekstrakta u reagens bez dodavanja enzima (tirozinaze). Posle 10 min inkubacije na 25 °C, očitane su apsorbance uzorka i slepe kontrole na 492 nm. Apsorbanca slepe kontrole je oduzeta od apsorbance uzorka, a antitirozinazna aktivnost je izražena kao miligram ekvivalenata kojične kiseline po gramu ekstrakta (mg KAE/g ekstrakta).

3.3.4.3 Inhibicija amilaze i glukozidaze

Ispitivanje inhibitorne aktivnosti ekstrakata na amilazu je urađeno prema Uysal i saradnika [136]. Za ispitivanje inhibitorne aktivnosti ekstrakata na α -amilazu, ekstrakt (100 mg/mL) je pomešan sa rastvorom α -amilaze (iz pankreasa svinje, EC 3.2.1.1, Sigma) (50 μ L) u fosfatnom puferu (pH 6,9 sa 6 mM natrijum hlorida), u mikrotitarskim pločama sa 96 bunarčića, a zatim je smeša inkubirana na 37 °C tokom 10 min. Nakon inkubacije, reakcija je započeta dodatkom rastvora skroba (50 μ L, 0,05%). Slepa kontrola je pripremljena dodavanjem ekstrakta svim reagensima bez dodatka enzima α -amilaze, a reakciona smeša je inkubirana takođe 10 min na 37 °C. Nakon isteka vremena, reakcija je zaustavljena dodatkom 1 M HCl (25 μ L), a zatim je dodat Lugolov rastvor (100 μ L). Po

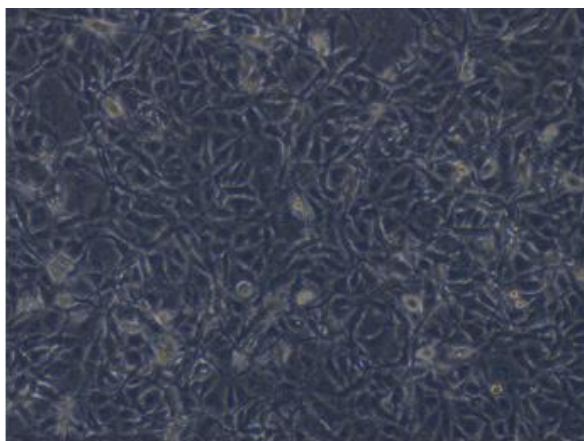
dodavanju rastvora, apsorbance uzorka i slepe kontrole su očitane na 630 nm. Apsorbanca slepe kontrole je oduzeta od apsorbance uzorka i inhibitorna aktivnost α -amilaze je izražena kao ekvivalenti akarboze po gramu ekstrakta (mmol AKE/g ekstrakta).

Za ispitivanje inhibitorne aktivnosti ekstrakata na α -glukozidazu, ekstrakt (100 mg/mL) je pomešan sa glutationom (50 μ L), rastvorom α -glukozidaze (iz *Saccharomyces cerevisiae*, EC 3.2.1.20, Sigma) (50 μ L) u fosfatnom puferu (pH 6) i PNPG (4-N-nitrofenil- α -D-glukopiranozid, Sigma) (50 μ L). Reakcija je izvedena u mikrotitarskoj ploči sa 96 bunarčića i uzorci su inkubirani tokom 15 min na 37 °C. Slepa kontrola je pripremljena dodavanjem ekstrakta svim reagensima bez dodatka enzima α -glukozidaze, a reakciona smeša je inkubirana 10 min na 37 °C. Po isteku vremena, reakcija je zaustavljena dodatkom 0,2 M natrijum karbonata (50 μ L), a apsorbance uzoraka i slepe kontrole su očitane na 400 nm. Apsorbanca slepe kontrole je oduzeta od apsorbance uzorka i inhibitorna aktivnost α -glukozidaze je izražena kao ekvivalenti akarboze po gramu ekstrakta (mmol AKE/g ekstrakta) [136].

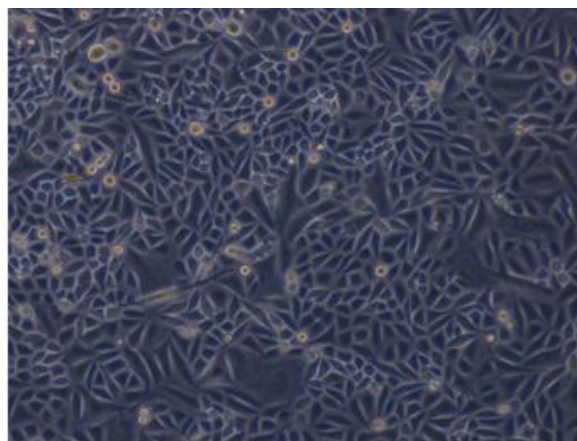
3.3.5 Ispitivanje antiproliferativnog potencijala ekstrakata

3.3.5.1 Čelijske linije i uslovi gajenja

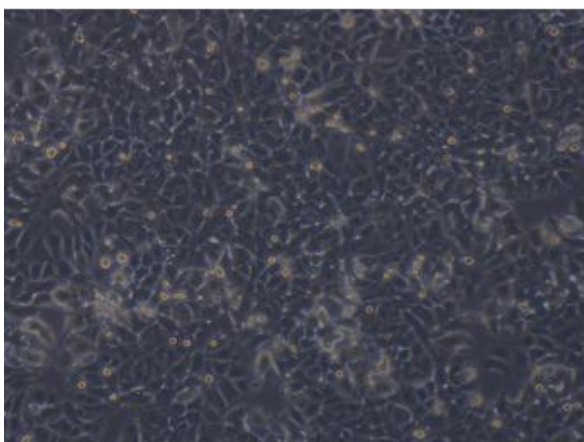
Za ispitivanje antiproliferativnog potencijala ekstrakata korišćene su tumorske čelijske linije (A172 (ATCC® CRL-1620™) – čelijska linija glioblastoma, SiHa (ATCC® HTB-35™) – čelijska linija cervikalnog karcinoma, MCF7 (ATCC® HTB-22™) – čelijska linija karcinoma dojke i HepG2 (ATCC® HB-8065™) – čelijska linija humanog hepatocelularnog karcinoma). Imortalizovana čelijska linija keratinocita kože (HaCaT) (AddexBio No. T0020001) i primarna čelijska linija humanih gingivalnih fibroblasta (HGF1) (ATCC® CRL-2014) korišćene su za analizu antiproliferativnog potencijala analiziranih ekstrakata na netumorske čelijske linije (**Slika 20**).



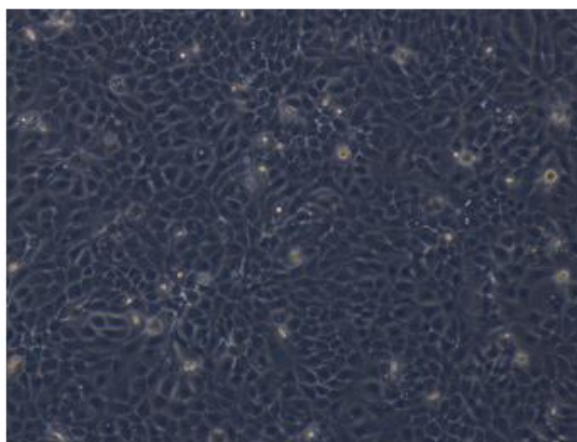
A172



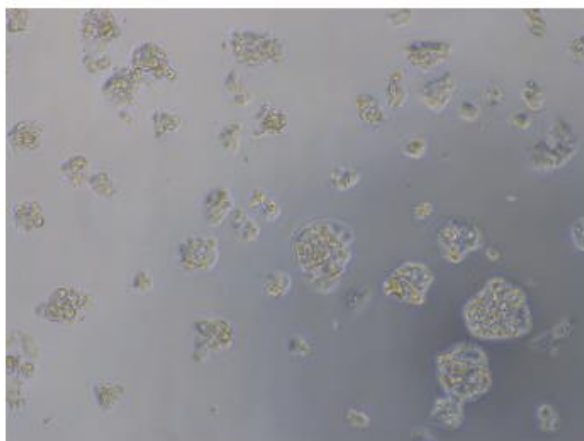
SiHa



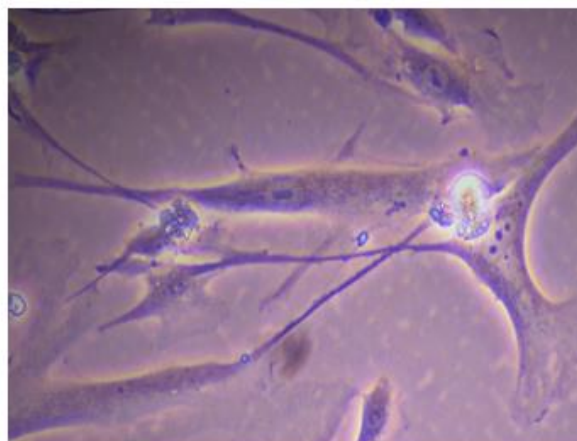
MCF7



HaCaT



HepG2



HGF1

Slika 20. Ćelijske linije korišćene u radu

Ćelijske linije MCF-7, SiHa, A172 i HaCaT su gajene u DMEM-u (Dulbecco's Modified Eagle Medium) sa visokim sadržajem glukoze i dodatkom 10% FBS-a (Fetal bovine serum), 2 mM L-glutamina i 1% penicilina i streptomocina (Invitrogen) na 37°C uz

10% CO₂. Čelije hepatocelularnog karcinoma HepG2 su kultivisane u DMEM-u sa niskim sadržajem glukoze i dodatkom 10% FBS-a, 1% neesencijalnih amino kiselina i 1% penicilina i streptomicina na 37°C uz 10% CO₂. HGF-1 čelije su gajene u bazalnom medijumu za fibroblaste (ATCC® PCS-201-030™) na 37 °C uz 10% CO₂.

3.3.5.2 Ispitivanje antiproliferativnog potencijala ekstrakta

Za ispitivanje antiproliferativnog potencijala metanolnih ekstrakta testiranih biljaka korišćen je kristal violet test [137]. 48h pre tretmana (HGF-1), odnosno dan pre tretmana (MCF-7, SiHa, A172, HepG2 i HaCaT), 4×10^3 ćelija je zasejano po bunarčiću u mikrotitarskoj ploči sa 96 bunarčića. Na dan tretmana, ćelijama je dodat svež medijum sa različitim koncentracijama ekstrakata rastvorenih u dimetil sulfoksidu (DMSO) i ćelije su inkubirane sa ekstraktom 48 h. Nakon tog perioda, ćelije su dva puta isprane PBS-om (*eng.* "Phosphate-buffered saline"); obojene 0,4% (HGF-1), odnosno 0,5% (MCF-7, SiHa, A172, HepG2 i HaCaT) rastvorom kristal violeta tokom 20 minuta (HGF-1), odnosno 15 minuta (MCF-7, SiHa, A172, HepG2 i HaCaT) na sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja boje, ćelije su isprane pod mlazom vode i ploče su ostavljene da se suše na vazduhu na sobnoj temperaturi. Nakon toga, boja je rastvorena u metanolu i merena je apsorbancija boje u čitaču mikrotitarske ploče Infinite 200 PRO na 570 (HGF-1), odnosno 590 nm (MCF-7, SiHa, A172, HepG2 i HaCaT). Kontrolne ćelije su tretirane istim procentom DMSO kao tretman sa najvećom koncentracijom ekstrakta, a koncentracija DMSO u testu nije prelazila 0,5%. Eksperiment je urađen u tri ponavljanja za svaku koncentraciju ekstrakta i izvedena su tri nezavisna eksperimenta.

3.3.5.3 Imunofluorescentna citohemijska analiza

Imunocitohemijska ispitivanja su primenjena na modelu ćelijske linije glioblastoma A172. Ukratko, protokol se sastojao od sledećeg: 24 h pre tretmana $2,5 \times 10^4$ A172 ćelija je zasejano po bunarčiću na pokrovnim stakalcima u ploči sa 12 bunarčića. Nakon toga, ćelije su tretirane ekstraktima (koncentracije koje dovode do 50% inhibicije rasta ćelija (IC₅₀)) ili DMSO-om (kontrolne ćelije) tokom 48 h. Zatim, ćelije su fiksirane u 4% paraformaldehidu tokom 15 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim "oprane" 3 puta po 20 minuta u 1 x PBS. Nakon toga, ćelije su permeabilizovane u 0,2% Triton X-100 u PBS-u tokom 10 min, a zatim je usledilo blokiranje nespecifičnog vezivanja antitela tokom 1 h na sobnoj temperaturi inkubacijom ćelija u rastvoru koji je sadržavao 10% serum (*eng.* "Normal goat serum", dobijen od neimunizovanih zdravih koza), 1% BSA (*eng.* "Bovine serum albumin") u PBS-u. Primarna antitela, anti-Ki67 antitela zeca (Abcam, razblaženje 1:250) i anti-tubulinska antitela miša (Abcam, razblaženje 1:100) su razblažena u PBS-u koji je sadržavao 1% BSA/0,1% Triton X-100. Posle jednog sata inkubacije na sobnoj temperaturi sa anti-Ki67 antitelom, ćelije su "oprane" 3 puta po 15 minuta u 0,1% Triton X-100 u PBS-u i inkubirane sa sekundarnim anti-zečjim sekundarnim antitelom konjugovanim sa Aleka FluorH 488 (Invitrogen, razblaženje 1:500 u 1% BSA/0,1% Triton X-100 u PBS) tokom 1 h. Nakon toga, ćelije su "oprane" 3 puta po 15 minuta u 0,1% Triton X-100 u PBS-u i obojene diaminofenilindolom (DAPI - 0,1 mg/mL; Sigma-Aldrich). Za vizuelizaciju rezultata korišćen je fluorescentni mikroskop Olympus BX51 sa odgovarajućim filterima i softver Cytovision (Applied Imaging Corporation).

U daljem eksperimentu, nakon inkubacije preko noći na 4°C sa mišjim antitubulinskim antitelom, ćelije su "oprane" 3 puta po 15 minuta u 0,1% Triton X-100 u PBS-u i inkubirane jedan sat na sobnoj temperaturi sa biotinizovanim anti-mišjim IgG antitelom (Vector Laboratories, razblaženje 1:250 u 1% BSA/0,1% Triton X-100 u PBS-u). Posle "pranja" 3 puta po 15 minuta u 0,1% Triton X-100 u PBS-u, ćelije su inkubirane sa DyLight 594 Streptavidin antitelom (Vector Laboratories, razblaženje 1:500 u PBS-u) tokom jednog sata na sobnoj temperaturi. Posle "pranja" 3 puta po 15 minuta u 0,1% Triton X-100 u PBS-u, jedra su obojena diaminofenilindolom (DAPI - 0,1 mg/mL; Sigma-Aldrich). Za vizuelizaciju rezultata korišćen je konfokalni mikroskop TCS SP8 (Leica Microsystems) uz primenu softvera LAS AF-TCS SP8 (Leica Microsystems).

3.3.6 Ispitivanje anti-inflamatornog potencijala ekstrakata određivanjem nivoa IL-6 i IL-8 u HaCaT ćelijama

Ispitivanje ovog aspekta biološke aktivnosti je važno sa aspekta farmaceutske industrije, jer je niz različitih oboljenja danas povezan sa različitim upalnim procesima u organizmu.

Ispitivan je nivo IL-6 i IL-8 u HaCaT ćelijama nakon njihovog izlaganja bakterijama i tretmanu ekstraktima. HaCaT ćelije su gajene u pločama sa 6 bunarčića sa adhezivnim dnom do pojave konfluentnosti. Zatim je medijum uklonjen i svež DMEM bez FBS-a sa ekstraktima (IC₂₅) je dodat ćelijama, koje su potom inkubirane 15 minuta na 37 °C. Zatim je ćelijama dodato 100 µL bakterije *S. aureus* (10⁸ CFU/mL), i usledila je inkubacija na 37 °C tokom 4 h, kako bi se proizveo inflamatorni odgovor kod keratinocita. Medijum je pokupljen, centrifugiran 10 minuta na 1000 rpm tokom i korišćen za određivanje nivoa IL-6 pomoću humanog IL-6 ELISA kompleta (EH2IL6, Invitrogen, Beč, Austrija) i humanog IL-8 kompleta (KAC1301, Invitrogen, Beč, Austrija), prema instrukcijama proizvođača.

Za određivanje nivoa IL-6, svaki uzorak, standardi i blank su analizirani u duplikatu. Na početku, bunarčići u mikrotitarskoj ploči su isprani dva puta sa 400 µL pufera za ispiranje uz temeljnu aspiraciju sadržaja između ispiranja. Nakon toga, dodato je 100 µL test pufera (1x) u prazne bunarčiće, 50 µL test pufera (1x) u bunarčiće za uzorke i 50 µL svakog uzorka u bunarčiće za uzorke. Nakon ovog koraka, dodato je 50 µL biotin-konjugata u sve bunarčiće; uzorci su pokriveni lepljivom folijom i inkubirani na sobnoj temperaturi tokom 2 h. Nakon perioda inkubacije, uklonjena je lepljiva folija, bunarčići su ispražnjeni i "oprani" 4 puta puferom za ispiranje. Dodato je 100 µL razblaženog Streptavidin-HRP rastvora u sve bunarčiće, opet pokriveno lepljivom folijom i inkubirano na sobnoj temperaturi 1 h. Nakon perioda inkubacije, ponovo je uklonjena lepljiva folija, bunarčići su ispražnjeni i isprani četiri puta puferom za ispiranje. Zatim je dodato 100 µL TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin) supstrata u sve bunarčiće i ploče su inkubirane na sobnoj temperaturi približno 10 minuta. Enzimaska reakcija je stopirana dodavanjem 100 µL Stop rastvora, a apsorbansa svakog uzorka je očitana na spektrofotometru na 450 nm. Nivoi IL-6 su određeni sa kalibracione krive u netretiranim HaCaT ćelijama, HaCaT ćelijama inokulisanim sa *S. aureus* i HaCaT ćelijama tretiranim ekstraktima i inokulisanim sa *S. aureus* i predstavljeni kao pg/mL.

Za određivanje nivoa IL-8, dodato je 100 µL inkubacionog pufera u svaki bunarčić, osim u bunarčiće sa slepom kontrolom. Dodato je 100 µL standarda ili uzoraka u

odgovarajuće bunarčiče. Nakon toga, dodato je 50 µL rastvora anti-IL-8 HRP konjugata u svaki bunarčić osim u slepu kontrolu. Usledila je inkubacija 2 h na sobnoj temperaturi na horizontalnom šejkeru podešenom na 700 rpm/min ± 10 rpm/min. Nakon inkubacije, temeljno je aspiriran sadržaj bunarčića a zatim su bunarčići isprani tri puta u 1 x puferu za ispiranje, a nakon toga je u svaki bunarčić dodato 100 µL hromogenog TMB. Usledila je inkubacija 15 minuta na sobnoj temperaturi, u mraku. Nakon toga dodato je 100 µL Stop rastvora u svaki bunarčić. Apsorbanca uzoraka je očitana na 450 nm. Nivoi IL-8 su određeni sa kalibracione krive u netretiranim HaCaT ćelijama, HaCaT ćelijama inokulisanim sa *S. aureus* i HaCaT ćelijama tretiranim ekstraktima i inokulisanim sa *S. aureus* i predstavljeni kao pg/mL.

3.4 Hemijska analiza ekstrakata

Za kvalitativnu analizu i detaljan hemijski profil ekstrakata testiranih biljaka korišćen je UHPLC-LTQ-Orbitrap/MS, dok je za kvantitativnu analizu korišćen LC-DAD-ESI/MS.

3.4.1 UHPLC-LTQ-Orbitrap/MSⁿ kvalitativna analiza i hemijski profil ekstrakata

Kvalitativna hemijska karakterizacija ekstrakata testiranih biljaka je urađena pomoću UHPLC-LTQ-Orbitrap uređaja prema prethodno opisanoj metodi [138]. Acetonitril i mravlja kiselina (LC/MS kvaliteta) su nabavljeni od Merck-a (Darmstadt, Nemačka), dok su standardi fenolnih jedinjenja nabavljeni od Sigma Aldrich (Steinheim, Nemačka). Špricevi sa filterima (25 mm, najlonska membrana, 0,45 µm) obezbeđeni su od strane PSI Lab (Beograd, Srbija).

Odvajanje tečnom hromatografijom ultra visokih performansi (UHPLC) je sprovedeno na sistemu Accela 600 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka), dok je odvajanje analita postignuto na 40 °C korišćenjem Synchronis C18 kolona (100 × 2,1 mm, 1,7 mm) kompanije Thermo Fisher Scientific. Mobilna faza je bila sastavljena od 0,1% vodenog rastvora mravlje kiseline (A) i acetonitrila sa 0,1% mravljom kiselinom (B). Brzina protoka je bila konstantna na 0,275 mL/min, a zapremina injektovanog uzorka podešena na 5 mL. Maseni spektrometar LTQ OrbiTrap XL (ThermoFisher Scientific, Bremen, Nemačka) je spojen na UHPLC pomoću elektrosprej jonizacije na povišenoj temperaturi (HESI-II interfejs), koji je radio u režimu negativne jonizacije.

Za kontrolu instrumenta i analizu podataka korišćen je Xcalibur softver (verzija 2.1, Thermo Fisher Scientific, Valtham, MA, Sjedinjene Američke Države), dok je program za uređivanje molekula, ChemDraw (verzija 12.0, CambridgeSoft, Cambridge, MA, Sjedinjene Američke Države) korišćen za crtanje strukture i za izračunavanje tačnih masa jedinjenja od interesa. Dostupni podaci o fragmentaciji MS korišćeni su za tentativnu identifikaciju nekih jedinjenja za koja nisu bili dostupni standardi.

3.4.2 LC-DAD-ESI/MSⁿ hemijska analiza i kvantifikacija jedinjenja

Kvantifikacija jedinjenja testiranih ekstrakata je urađena pomoću LC-DAD-ESI/MSⁿ (Dionex Ultimate 3000 UPLC, Thermo Scientific, San Jose, CA, Sjedinjene Američke Države) prema metodi Barros i saradnika [139]. Za prečišćavanje, rastvor ekstrakta je nanesen na C-18 SepPak Vac 3cc kertridž (Phenomenex), koji je prethodno aktiviran metanolom, pa vodom; šećeri i više polarna jedinjenja uklonjeni su prolaskom kroz 10 mL vode i ekstrakt je dalje rastvoren u 5 mL rastvora metanol:voda (80:20). Ekstrakt je filtriran kroz LC filter disk od 0.22 µm za jednokratnu upotrebu i analiziran pomoću LC-DAD-ESI/MSⁿ (Dionex Ultimate 3000 UPLC, Thermo Scientific, San Jose, CA, Sjedinjene Američke Države) [140].

Kao mobilna faza korišćeni su 0.1% mravlja kiselina u vodi (faza A) i acetonitril (faza B). Injekciona zapremina uzorka je bila 5 µL, a eluiranje je vršeno gradijentom po sledećoj šemi: 0 – 5 min, 15% B; 5 – 10 min, 15 – 20% B; 10 – 20 min, 20 – 25% B; 20 – 30 min, 25 – 35% B; 30 – 40 min, 35 – 50% B, nakon čega je sledila re-ekvilibracija kolone.

Brzina protoka iznosila je 0,5 mL/min, a UV apsorbanca je merena na 280, 330 i 370 nm. Pritisak nosećeg gasa (N₂) iznosio je 20 psi, dok je pritisak raspršivača bio 40 psi na 400 °C. Za elektrosprej jonizaciju primenjen je negativan mod pri kapilarnom naponu od 4500 V. Dvostruka detekcija je izvedena korišćenjem DAD (280, 330 i 370 nm kao poželjne talasne dužine) i masenog spektrometra (MS). MS detekcija je izvedena u negativnom režimu korišćenjem masenog spektrometra Linear Ion Trap LTQ XL (Thermo Finnigan, San Jose, CA, Sjedinjene Američke Države) opremljenog sa ESI izvorom. Identifikacija jedinjenja je izvršena na osnovu karakterističnog izgleda UV spektra i molekulske formule izračunate iz preciznih masa kvazimolekulskih jona u ESI masenim spektrima. UV spektri, MS spektri i retencionna vremena identifikovanih jedinjenja su potom upoređeni sa odgovarajućim podacima za standardna jedinjenja, ili i sa literaturnim podacima. Prikupljanje podataka je obavljeno pomoću Xcalibur® sistema podataka (Thermo Finnigan, San Jose, CA, Sjedinjene Američke Države). Za kvantitativnu analizu, kalibraciona kriva za svaki raspoloživi fenolni standard je konstruisana na osnovu UV-vis signala. Za identifikovana fenolna jedinjenja za koje komercijalni standard nije bio dostupan, kvantifikacija je izvršena omoću kalibracione krive najslabijeg dostupnog standarda. Rezultati su izraženi kao mg/g suvog ekstrakta.

4 REZULTATI I DISKUSIJA

4.1 Analiza prinosa ekstrakata

Nakon sukcesivne ekstrakcije biljnog materijala metanolom iz nadzemnih delova biljaka *A. cerefolium*, *O. spinosa* i *P. fruticosa* i uparavanja na rotacionom vakuum uparivaču do suvog ostatka, određen je njihov prinos. Utvrđeno je da je prinos ekstrakta za *A. cerefolium* iznosio 9,71% (w/w), za *O. spinosa* 8,84% (w/w), dok je za *P. fruticosa* iznosio 6,24% (w/w).

4.2 Analiza antibakterijske aktivnosti

Rezultati antibakterijske aktivnosti metanolnog ekstrakta biljke *A. cerefolium* su prikazani u **Tabeli 3**. Antibakterijska aktivnost je testirana na osam sojeva patogenih bakterija, uključujući i sojeve rezistentne na komercijalno dostupne antibiotike. Dobijeni rezultati ukazuju na ujednačeni i umereni antibakterijski potencijal metanolnog ekstrakta krbuljice. Kao najznačajni rezultat, izdvaja se dejstvo ekstrakta na meticilin-rezistentni soj *S. aureus*, kod koga je ekstrakt ispoljio najjaču antibakterijsku aktivnost (MIK= 1,25 mg/mL; MBK= 2,50 mg/mL). Suprotno tome, najmanji antibakterijski potencijal ekstrakta detektovan je kod sledećih sojeva: *S. aureus* (ATCC 11632), *S. Enteritidis* (ATCC 13076) i *M. luteus* (ATCC 10240); vrednosti minimalnih inhibitornih/baktericidnih koncentracija su bile jednake za ove sojeve i iznosile su MIK= 2,50 mg/mL i MFK= 5,00 mg/mL. Za sojeve *S. Typhimurium* (ATCC 13311), *E. coli* rezistentna i *E. cloacae* (ATCC 35030) detektovano je jednako inhibitorno i baktericidno dejstvo testiranog ekstrakta (MIK= MBK= 2,50 mg/mL).

Tabela 3. Antibakterijska aktivnost metanolnog ekstrakta *A. cerefolium* (MIK i MBK mg/mL).

Bakterije		<i>A. cerefolium</i>	Streptomicin	Ampicilin
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 11632)	MIK	2,50	0,17	0,34
	MBK	5,00	0,25	0,37
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	MIK	1,25	0,10	-
	MBK	2,50	-	-
<i>Salmonella Typhimurium</i> (ATCC 13311)	MIK	2,50	0,20	0,75
	MBK	2,50	0,30	1,20
<i>Salmonella Enteritidis</i> (ATCC 13076)	MIK	2,50	1,00	0,75
	MBK	5,00	1,00	1,50
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 10240)	MIK	2,50	0,05	0,10
	MBK	5,00	0,10	0,15
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	MIK	2,50	0,20	0,40
	MBK	5,00	0,30	0,50
<i>Escherichia coli</i> rezistentna	MIK	2,50	0,10	0,10
	MBK	2,50	0,20	-
<i>Enterobacter cloacae</i> (ATCC 35030)	MIK	2,50	0,04	0,08
	MBK	2,50	0,25	0,40

MIK i MBK koncentracije za testirane komercijalno dostupne lekove (streptomycin i ampicilin) su bile niže u poređenju sa vrednostima za metanolni ekstrakt testirane vrste *A. cerefolium*. Rezultati pokazuju da ampicilin nije imao antibakterijsko dejstvo na MRSA soj, niti baktericidno dejstvo na rezistentni soj *E. coli*, dok streptomycin nije inhibirao rast MRSA soja; sa druge strane oba soja su bila osetljiva na dejstvo ekstrakta (**Tabela 4**). Dobijeni rezultati su značajni sa stanovišta antimikrobne rezistencije, jer ekstrakt krbuljice ispoljava i inhibitorno i baktericidno delovanje na sve testirane sojeve, što nije slučaj sa komercijalnim antibioticima. Takođe, treba imati u vidu da do sada nema publikovanih podataka o antimikrobnom potencijalu metanolnog ekstrakta *A. cerefolium*, ali je zabeležena antimikrobna aktivnost etarskih ulja iz biljaka koje pripadaju rodu *Anthriscus*. Tako, rezultati dobijeni od strane Lai i saradnika [43] pokazuju da etarsko ulje dobijeno iz nadzemnih delova biljke *A. caucalis* M. Bieb deluje inhibitorno na rast bakterija *Bacillus subtilis* i *Escherichia coli* (MIK = 0,095 mg/mL i 0,105 mg/mL, redom). Dalje, etarsko ulje dobijeno iz korena *A. nemorosa* (Bieb.) Sprengel pokazalo je značajnu antibakterijsku (*Staphylococcus epidermidis*, *B. subtilis* i *E. coli*) [44].

Rezultati antibakterijske aktivnosti metanolnog ekstrakta dobijenog iz nadzemnih delova *O. spinosa* prikazani su u **Tabeli 4**.

Tabela 4. Antibakterijska aktivnost metanolnog ekstrakta *O. spinosa* (MIK i MBK mg/mL).

Bakterije		<i>O. spinosa</i>	Streptomycin	Ampicilin
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 11632)	MIK	5,00	0,17	0,34
	MBK	5,00	0,25	0,37
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	MIK	10,00	0,10	-
	MBK	10,00	-	-
<i>Salmonella Typhimurium</i> (ATCC 13311)	MIK	5,00	0,20	0,75
	MBK	10,00	0,30	1,20
<i>Salmonella Enteritidis</i> (ATCC 13076)	MIK	2,50	1,00	0,75
	MBK	5,00	1,00	1,50
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 10240)	MIK	2,50	0,05	0,10
	MBK	5,00	0,10	0,15
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	MIK	2,50	0,20	0,40
	MBK	2,50	0,30	0,50
<i>Escherichia coli</i> rezistentna	MIK	1,25	0,10	0,10
	MBK	2,50	0,20	-
<i>Enterobacter cloacae</i> (ATCC 35030)	MIK	1,25	0,04	0,08
	MBK	1,25	0,25	0,40

Antibakterijski potencijal metanolnog ekstrakta *O. spinosa* je ispitan na osam sojeva bakterija, uključujući rezistentne sojeve *E. coli* i MRSA. Dobijeni rezultati ukazuju na umerenu antibakterijsku aktivnost ekstrakta na testirane bakterije, u opsegu od 1,25 mg/mL do 10 mg/mL, zavisno od testiranog soja. Najosetljiviji soj na dejstvo ekstrakta bio je *E. cloacae* sa jednakim vrednostima MIK i MBK= 1,25 mg/mL. S druge strane,

najotporniji soj bio je MRSA soj, uz takođe jednake vrednosti MIK=MBK= 10 mg/mL. Poređenjem rezultata dobijenih za ekstrakt i komercijalne antibiotike može se zaključiti da je u većini slučajeva dejstvo antibiotika bilo izraženije, ali je značajno istaći da je ekstrakt bio aktivan i protiv soja MRSA i rezistentne *E. coli*, što nije slučaj sa ampicilinom (Tabela 4). Predstavljeni rezultati su pionirski u pogledu aktivnosti ekstrakta *O. spinosa* protiv rezistentnih sojeva bakterija, što je od izuzetnog značaja u farmaceutskoj industriji. Potencijal ekstrakta ogleda se u činjenici da proizvodi prirodnog porekla mogu predstavljati novu nadu u borbi protiv rezistentnih bakterija, globalnog problema koji je i značajan uzrok mortaliteta svih uzrasnih kategorija [141]. Dosadašnja istraživanja antimikrobnog potencijala zečjeg trna su pokazala da je vodeni ekstrakt *O. spinosa* dobijen iz nadzemnih delova bio aktivan protiv *Listeria monocytogenes* i *L. ivanovii*, uz vrednosti MIK 12,5 µg/mL i 50 µg/mL, redom [51]. Analizom antibakterijskog dejstva infuzije dobijene iz korena *O. spinosa* na *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermii* *tuberculosis* detektovane su vrednosti za baktericidnu aktivnost u opsegu 8-128 µg/mL [56]. Takođe, rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji su ukazali na slabiji antibakterijski potencijal metanolnog ekstrakta *O. spinosa* dobijenog iz nadzemnog dela biljke u poređenju sa antibakterijskim potencijalom ekstrakta dobijenog iz korena ove biljke [56].

Tabela 5. Antibakterijska aktivnost metanolnog ekstrakta *P. fruticosa* (MIK i MBK mg/mL).

Bakterije		<i>P. fruticosa</i>	Streptomycin	Ampicilin
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 11632)	MIK	1,25	0,17	0,34
	MBK	1,25	0,25	0,37
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	MIK	1,25	0,10	-
	MBK	1,25	-	-
<i>Salmonella Typhimurium</i> (ATCC 13311)	MIK	5,00	0,20	0,75
	MBK	10,00	0,30	1,20
<i>Salmonella Enteritidis</i> (ATCC 13076)	MIK	5,00	1,00	0,75
	MBK	5,00	1,00	1,50
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 10240)	MIK	2,50	0,05	0,10
	MBK	5,00	0,10	0,15
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	MIK	2,50	0,20	0,40
	MBK	2,50	0,30	0,50
<i>Escherichia coli</i> rezistentna	MIK	2,50	0,10	0,10
	MBK	2,50	0,20	-
<i>Enterobacter cloacae</i> (ATCC 35030)	MIK	2,50	0,04	0,08
	MBK	2,50	0,25	0,40

Rezultati analize antibakterijske aktivnosti ekstrakta *P. fruticosa* prikazani u Tabeli 5 su pokazali da je ekstrakt najaktivniji protiv sojeva *S. aureus* (ATCC 11632) i MRSA sa jednakim opsegom vrednosti MIK i MBK (1,25 mg/mL), dok je najrezistentniji soj bio *Salmonella Typhimurium*, uz MIK= 5 mg/mL i MBK= 10 mg/mL. Baktericidna aktivnost

ekstrakta *P. fruticosa* je posebno izražena ka rezistentnim sojevima, koji su istovremeno bili otporni na dejstvo komercijalnih terapeutika: rast MRSA soja nije u potpunosti inhibirao ni streptomycin ni ampicilin, dok je u slučaju rezistentnog soja *E. coli*, rast u potpunosti bio inhibiran samo delovanjem streptomicina (MIK=0.10 mg/mL, MBK=0.20 mg/mL). Dobijeni rezultati ukazuju da antibakterijski efekat ekstrakta zavisi od testiranog soja i da se ne može pripisati razlikama u sastavu ćelijskog zida Gram negativnih i Gram pozitivnih bakterija. Kako ekstrakt predstavlja mešavinu različitih jedinjenja, njegova aktivnost potencijalno može biti rezultat sinergističkog delovanja više jedinjenja (fenola) koji doprinose antibakterijskom potencijalu preko različitih i višestrukih načina delovanja. Ova studija je prva koja opisuje antibakterijsku aktivnost *P. fruticosa* ka rezistentnim bakterijskim vrstama.

Poređenjem rezultata dobijenih za antibakterijsku aktivnost metanolnih ekstrakata biljaka *A. cerefolium*, *O. spinosa* i *P. fruticosa*, može se zaključiti da je metanolni ekstrakt *P. fruticosa* ispoljio najbolje baktericidno dejstvo na rezistentan soj MRSA (MBK= 1,25 mg/mL), u poređenju sa ekstraktima *A. cerefolium* (MBK= 2,50 mg/mL) i *O. spinosa* (MBK= 10,00 mg/mL). Sa druge strane, metanolni ekstrakt *O. spinosa* se pokazao kao aktivniji protiv rezistentnog soja *E. coli* (MIK= 1,25 mg/mL) u odnosu na metanolne ekstrakte *A. cerefolium* i *P. fruticosa* kod kojih su detektovane više, ali ujednačene vrednosti MIK (2,50 mg/mL).

4.2.1 Analiza efekata ekstrakata na formiranje bakterijskog biofilma

Infekcije združene s biofilmom (strukturnom zajednicom mikroorganizama) najčešće je teško lečiti, jer ove strukture poseduju značajnu otpornost na postojeće lekove, što dovodi do hroničnog toka bolesti, uz mali procenat izlečenja [142]. Stoga su prirodni agensi koji sprečavaju formiranje biofilma izuzetno važna strategija u borbi protiv uzročnika ovih specifičnih infekcija, jer između ostalog mogu omogućiti i antibakterijskim lekovima da deluju.

Tabela 6. Efekti metanolnih ekstrakata *A. cerefolium*, *O. spinosa* i *P. fruticosa* na formiranje biofilma *S. aureus* pri sub-MIK (rezultati predstavljeni kao % inhibicije).

	1/2 MIK	1/4 MIK	1/8 MIK	1/16 MIK	1/32 MIK
<i>A. cerefolium</i>	69,88±6,86	67,91±4,99	44,25±4,70	NI	NI
<i>O. spinosa</i>	78,84±4,24	81,22±6,96	54,33±3,21	NI	NI
<i>P. fruticosa</i>	82,35±3,17	64,13±5,49	61,78±5,51	32,16±4,36	12,21±1,15
Streptomycin	55,64±2,12	35,33±1,47	33,22±1,08	15,21±1,12	NI

NI – formiranje biofilma nije inhibirano pri testiranoj koncentraciji.

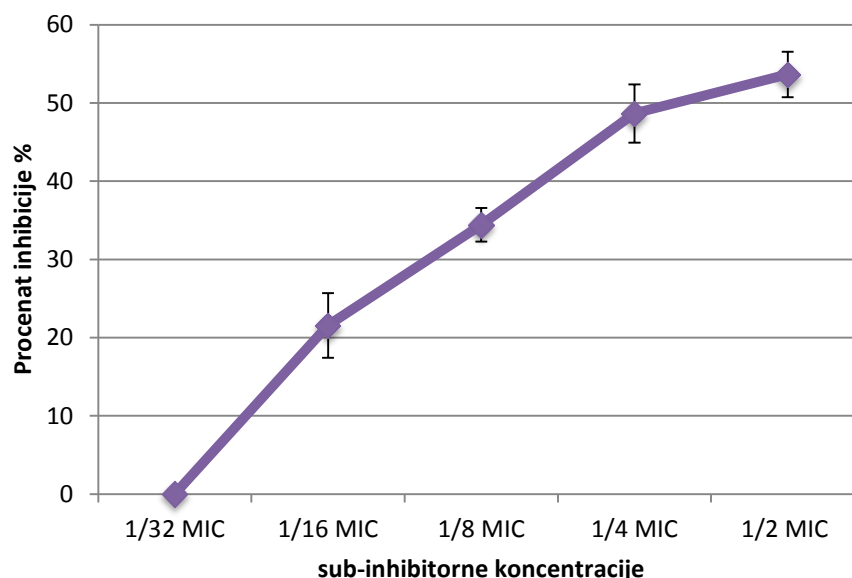
Imajući u vidu da su širom sveta uzročnici upornih infekcija hroničnog toka upravo bakterije organizovane u bakterijske agregate ili biofilme, ispitivani su efekti sub-

inhibitornih koncentracija (subMIK) ekstrakta testiranih biljaka na formiranje biofilma *S. aureus* (Tabela 6). Inhibicija formiranja *S. aureus* biofilma je postignuta na sub-inhibitornim koncentracijama ekstrakta *A. cerefolium*. Bakterijski biofilm je bio inhibiran pri 1/2 MIK za oko 70%, dok je pri nižim MIK kapacitet inhibicije bio smanjen. Biofilm je bio inhibiran ekstraktom *O. spinosa* za oko 80% na 1/2 x MIK i 1/4 x MIK, a inhibicija formiranja biofilma je postignuta i koncentracijom koja predstavlja 1/8 x MIK, ali je efekat bio manje izražen. Najizraženiju sposobnost za inhibiciju formiranja biofilma je imao ekstrakt *P. fruticosa*: 1/2 x MIK=82.35% inhibicije, a za njim sledi *O. spinosa* 1/4 x MIK= 81.22%. Istovremeno, komercijalni lek streptomycin je u manjoj meri inhibirao formiranje biofilma *S. aureus*, u poređenju sa ekstraktima.

4.2.2 Analiza efekata ekstrakata na produkciju stafiloksantina kod bakterije *S. aureus*

Stafiloksantin, karotenoidni pigment koji proizvodi *S. aureus* je veoma poznat faktor virulencije ovih bakterija [143]. Imajući u vidu da su ekstrakti bili aktivni kako protiv slobodno plutajućih bakterija *S. aureus* tako i protiv njihovog biofilma, ispitan je potencijal ekstrakata na proizvodnju faktora virulencije - stafiloksantina pri sub-inhibitornim koncentracijama. Inhibicija produkcije stafiloksantina je važna strategija za razvoj novih antistafilokoknih agenasa koji bi se mogli koristiti za snižavanje infektivnog potencijala *S. aureus* kako bi se na taj način sprečio dalji razvoj patogena.

Dobijeni rezultati su pokazali da je inhibicija produkcije stafiloksantina zavisila od primenjenog ekstrakta. Tako, ekstrakt *A. cerefolium* nije inhibirao proizvodnju stafiloksantina u *S. aureus* pri svim testiranim sub-inhibitornim koncentracijama. Za razliku od krbuljice, rezultati dobijeni za *O. spinosa* su pokazali da su koncentracije ekstrakta od 1/2 x MIK i 1/4 x MIK dovele do smanjenja proizvodnje stafiloksantina, dok ekstrakt nije bio efikasan u koncentracijama nižim od 1/4 x MIK. Detaljnije, nakon 24 h inkubacije sa ekstraktom proizvodnja stafiloksantina je bila inhibirana za 97,34 % na 1/2 x MIK i 84,65 % na 1/4 x MIK. Ovaj rezultat, pored toga što je prvi put pokazao inhibitorno delovanje ekstrakta zečjeg trna na proizvodnju stafiloksantina, važan je i zbog toga što je dokazuje da prirodni agensi mogu značajno uticati na proizvodnju faktora virulencije patogenih bakterija, što može predstavljati jedan od važnih strategija prilikom formulacije novih antibakterijskih agenasa. Rezultati dobijeni za metanolni ekstrakt *P. fruticosa* su pokazali da je najizraženija inhibicija proizvodnje stafiloksantina postignuta pri 1/2 x MIK (53,64%), dok nije zabeležena inhibicija pri 1/32 x MIK (Slika 21).



Slika 21. Procenat inhibicije proizvodnje stafiloksantina kod *S. aureus* pri sub-MIK metanolnog ekstrakta *P. fruticosa*

Dobijeni rezultati predstavljaju osnovu za dalja istraživanja koja bi mogla dovesti do razvoja prirodnih antistafilokoknih agenasa koji će u sub-inhibitornim koncentracijama inhibirati proizvodnju faktora virulencije ciljane bakterije, a samim tim i smanjiti njen potencijal virulencije.

4.3 Analiza antifungalne aktivnosti ekstrakata

Rezultati dobijeni analizom antifungalne aktivnosti ekstrakta *A. cerefolium* i komercijalnih antifungalnih lekova prikazani su u **Tabeli 7**. Antifungalna aktivnost ekstrakta je testirana na osam sojeva filamentoznih gljiva i na tri soja kvasaca. *P. aurantiogriseum* se pokazao kao gljiva koja je najosetljivija na antifungalno dejstvo metanolnog ekstrakta *A. cerefolium* (MIK= 0,16 mg/mL; MFK= 0,31 mg/mL). Sa druge strane, *P. ochrochloron* je bio najrezistentniji soj na dejstvo ekstrakta sa MIK od 2,50 mg/mL i MFK od 5,00 mg/mL. Ekstrakt je takođe ispoljio značajnu aktivnost na *A. fumigatus* (MIK= 0,31 mg/mL; MFK= 0,62 mg/mL). Takođe, kao značajan rezultat može se izdvojiti i inhibitorna aktivnost ekstrakta *A. cerefolium* na gljivu *A. ochraceus*, čiji je MIK (1,25 mg/mL) bio niži u poređenju sa komercijalnim antimikotikom ketokonazolom (MIK= 1,50 mg/mL). U svim ostalim slučajevima komercijalni antimikotici su ispoljili bolji antifungalni potencijal. Ekstrakt je delovao i na ispitivane sojeve *Candida* u rasponu MIK i MFK koncentracija od 0,62 mg/mL do 1,25 mg/mL. Dosadašnja istraživanja antifungalnog efekta vrsta roda *Anthriscus* su oskudna. Literaturni podaci pokazuju da je prethodno testirano etarsko ulje dobijeno iz korena *Anthriscus nemorosa* koje je pokazalo je aktivnost na soj *Candida albicans* [44].

Tabela 7. Antifungalna aktivnost metanolnog ekstrakta *A. cerefolium* (MIK i MFK mg/mL).

Mikrogljive		<i>A. cerefolium</i>	Ketokonazol	Bifonazol
<i>Aspergillus fumigatus</i> (ATCC 9197)	MIK	0,31	0,20	0,15
	MFK	0,62	0,50	0,20
<i>Aspergillus versicolor</i> (ATCC 11730)	MIK	0,62	0,20	0,10
	MFK	0,62	0,50	0,20
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 6275)	MIK	1,25	0,20	0,15
	MFK	1,25	0,50	0,20
<i>Aspergillus ochraceus</i> (ATCC 12066)	MIK	1,25	1,50	0,15
	MFK	2,50	2,00	0,20
<i>Trichoderma viride</i> (IAM 5061)	MIK	2,50	1,00	0,15
	MFK	2,50	1,00	0,20
<i>Penicillium funiculosum</i> (ATCC 36839)	MIK	0,62	0,20	0,20
	MFK	0,62	0,50	0,25
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> (izolat iz hrane)	MIK	0,16	0,20	0,10
	MFK	0,31	0,30	0,20
<i>Penicillium ochrochloron</i> (ATCC 9122)	MIK	2,50	1,00	0,20
	MFK	5,00	1,50	0,25
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	MIK	1,25	0,50	0,15
	MFK	1,25	1,00	0,30
<i>Candida krusei</i> (klinički izolat)	MIK	1,25	0,50	0,25
	MFK	1,25	1,00	0,50
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 750)	MIK	0,62	0,30	0,25
	MFK	1,25	0,50	0,50

Antifungalna aktivnost ekstrakta *O. spinosa* je testirana na osam sojeva filamentoznih gljiva i na tri soja kvasaca (Tabela 8). Antifungalna aktivnost ekstrakta bila je najizraženija kod *Penicillium aurantiogriseum* sa minimalnom inhibitornom koncentracijom od 0,02 mg/mL i minimalnom koncentracijom fungicida (MFK) od 0,04 mg/mL. S druge strane, najotporniji soj na dejstvo metanolnog ekstrakta *O. spinosa* bio je *Penicillium ochrochloron*, sa MIK od 5,00 mg/mL i MFK od 10 mg/mL. Antifungalna aktivnost testiranog ekstrakta opadala je sledećim redom: *Penicillium aurantiogriseum*, zatim *Aspergillus fumigatus*, *Candida tropicalis*, *A. versicolor*, *A. niger*, *Trichoderma viride*, *P. funiculosum*, *C. albicans*, *C. krusei*, *A. ochraceus* i *P. ochrochloron*. Vrednosti dobijene za ekstrakt *O. spinosa* su poredive sa onim koje su dobijene za komercijalne fungicide, a u nekim slučajevima i izraženije. Naime, najznačajniji antifungalni efekat *O. spinosa* je postigao na rast *A. fumigatus* i *P. aurantiogriseum*, na koje su komercijalni antifungalni lekovi ketokonazol i bifonazol pokazali slabiju aktivnost. Rezultati predstavljeni u ovoj tezi predstavljaju prve rezultate koji su pokazali antifungalni potencijal metanolnog ekstrakta dobijenog iz nadzemnih delova biljke *O. spinosa*. Dosadašnji literaturni podaci ukazuju na antifungalni potencijal ekstrakta dobijenog iz korena *O. spinosa*, koji se tradicionalno koristi u etnomedicini [56]. Tako, studija Deliorman Orhan i saradnika [56] je

pokazala da je infuzija dobijena od *Ononidis Radix* aktivna protiv sledećih vrsta gljiva: *Candida albicans* (MIK 0,016 mg/mL; MFK 0,064 mg/mL), *C. tropicalis* (MIK 0,016 mg/mL; MFK 0,064 mg/mL), *C. parapsilopsis* (MIK 0,008 mg/mL; MFK 0,016 mg/mL), *Trichophyton rubrum* (MIK 0,016 mg/mL; MFK nije određen), *Epidermophyton floccosum* (MIK 0,06 mg/mL; MFK nije određen) i *Microsporum gypseum* (MIK 0,032 mg/mL; MFK nije određen) [56]. Pored toga, etanolni i vodeni rastvori pepela dobijenog iz biljke *O. spinosa* [10] pokazali su antifungalnu aktivnost protiv vrsta iz roda *Candida*. Koncentracije su bile u rasponu od 1,25 µg/mL (*C. albicans*) - 40 µg/mL (*C. glabrata*) za etanolni rastvor pepela [10].

Tabela 8. Antifungalna aktivnost metanolnog ekstrakta *O. spinosa* (MIK i MFK mg/mL).

Mikrogljive		<i>O. spinosa</i>	Ketokonazol	Bifonazol
<i>Aspergillus fumigatus</i> (ATCC 9197)	MIK	0,08	0,20	0,15
	MFK	0,08	0,50	0,20
<i>Aspergillus versicolor</i> (ATCC 11730)	MIK	0,62	0,20	0,10
	MFK	1,25	0,50	0,20
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 6275)	MIK	0,62	0,20	0,15
	MFK	1,25	0,50	0,20
<i>Aspergillus ochraceus</i> (ATCC 12066)	MIK	2,50	1,50	0,15
	MFK	2,50	2,00	0,20
<i>Trichoderma viride</i> (IAM 5061)	MIK	0,62	1,00	0,15
	MFK	1,25	1,00	0,20
<i>Penicillium funiculosum</i> (ATCC 36839)	MIK	0,62	0,20	0,20
	MFK	1,25	0,50	0,25
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> (izolat iz hrane)	MIK	0,02	0,20	0,10
	MFK	0,04	0,30	0,20
<i>Penicillium ochrochloron</i> (ATCC 9122)	MIK	5,00	1,00	0,20
	MFK	10,00	1,50	0,25
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	MIK	0,62	0,50	0,15
	MFK	1,25	1,00	0,30
<i>Candida krusei</i> (klinički izolat)	MIK	0,62	0,50	0,25
	MFK	1,25	1,00	0,50
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 750)	MIK	0,31	0,30	0,25
	MFK	0,62	0,50	0,50

Antifungalni efekat ekstrakta *P. fruticosa* je testiran na jedanaest vrsta medicinski relevantnih filamentoznih gljiva i kvasaca (Tabela 9).

Tabela 9. Antifungalna aktivnost metanolnog ekstrakta *P. fruticosa* (MIK i MFK mg/mL)

Mikrogljive		<i>P. fruticosa</i>	Ketokonazol	Bifonazol
<i>Aspergillus fumigatus</i> (ATCC 9197)	MIK	0,31	0,20	0,15
	MFK	0,31	0,50	0,20
<i>Aspergillus versicolor</i> (ATCC 11730)	MIK	0,31	0,20	0,10
	MFK	0,62	0,50	0,20
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 6275)	MIK	5,00	0,20	0,15
	MFK	5,00	0,50	0,20
<i>Aspergillus ochraceus</i> (ATCC 12066)	MIK	2,50	1,50	0,15
	MFK	5,00	2,00	0,20
<i>Trichoderma viride</i> (IAM 5061)	MIK	0,62	1,00	0,15
	MFK	0,62	1,00	0,20
<i>Penicillium funiculosum</i> (ATCC 36839)	MIK	0,62	0,20	0,20
	MFK	1,25	0,50	0,25
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> (izolat iz hrane)	MIK	0,31	0,20	0,10
	MFK	0,62	0,30	0,20
<i>Penicillium ochrochloron</i> (ATCC 9122)	MIK	1,25	1,00	0,20
	MFK	2,50	1,50	0,25
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	MIK	0,62	0,50	0,15
	MFK	1,25	1,00	0,30
<i>Candida krusei</i> (klinički izolat)	MIK	1,25	0,50	0,25
	MFK	1,25	1,00	0,50
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 750)	MIK	0,62	0,30	0,25
	MFK	0,62	0,50	0,50

Najizraženiji antifungalni efekat ekstrakta postignut je protiv *Aspergillus fumigatus* MIK=MFK= 0.31 mg/mL, patogena koji inficira pluća imunokompromitovanih pacijenata uzrokujući aspergilozu. Najotpornija gljiva na efekat metanolnog ekstrakta *P. fruticosa* bila je *A. niger* sa jednakim vrednostima MIK i MFK (5 mg/mL), a što se tiče ostalih testiranih sojeva, antifungalna aktivnost je opadala sledećim redosledom: *A. fumigatus*, *A. versicolor*, *P. aurantiogriseum*, *T. viride*, *C. tropicalis*, *P. funiculosum*, *C. albicans*, *C. krusei*, *P. ochrochloron*, *A. ochraceus* i *A. niger*. Komercijalni antifungalni lekovi su efikasnije inhibirali rast većine testiranih patogenih gljiva od ekstrakata biljaka izuzev dejstva ekstrakta na *A. fumigatus* u poređenju sa ketokonazolom (MFK vrednosti od 0,31 mg/mL i 0,50 mg/mL, redom) i *T. viride* (0,62 mg/mL i 1 mg/mL, redom). Ova studija predstavlja prvu studiju koja ukazuje na antifungalni potencijal *P. fruticosa* protiv *A. fumigatus* i prva koja ukazuje na antifungalni potencijal ekstrakta *P. fruticosa* ka medicinski važnim vrstama iz roda *Candida*.

Poređenjem rezultata za sva tri ispitivana ekstrakta može se uočiti da je metanolni ekstrakt *O. spinosa* ispoljio bolji antifungalni potencijal u poređenju sa ekstraktima *A. cerefolium* i *P. fruticosa*. Kao najznačajniji rezultat može se izdvojiti dejstvo ekstrakta *O. spinosa* na *A. fumigatus* (MIK= 0,08; MFK= 0,08) na koje su komercijalni antifungalni lekovi

ketokonazol (MIK= 0,20; MFK= 0,50) i bifonazol (MIK= 0,15; MFK= 0,20) pokazali daleko slabiju aktivnost.

4.3.1 Aktivnost ekstrakata na formiran biofilm vrsta roda *Candida*

Gljivične infekcije združene sa formiranjem biofilma je teško lečiti jer su otporne na konvencionalne antifungalni tretmane, i ćelije gljiva uspešno izbegavaju i aktivnost imunskih ćelija domaćina [144]. Vrste roda *Candida* su u stanju da formiraju strukturirane zajednice u formi biofilma koje su pričvršćene za površine pomoću specifičnih signalnih molekula [145]. Rezultati antibiofilm aktivnosti metanolnih ekstrakata *A. cerefolium*, *O. spinosa* i *P. fruticosa* su predstavljeni u **Tabeli 10**.

Ekstrakt *A. cerefolium* je imao iste inhibitorne i fungicidne efekte na formirani biofilm kvasaca *C. albicans*, *C. krusei* i *C. tropicalis* (MIKB= 5mg/mL; MFKB= 10 mg/mL) (**Tabela 10**). Dobijeni rezultati ukazuju na značajan antibiofilm potencijal metanolnog ekstrakta *A. cerefolium*, naročito ukoliko se uzme u obzir da je vrednost MIKB (5 mg/mL) dobijena za krbuljicu, bila niža u poređenju sa MIKB (8 mg/mL) koja je dobijena za komercijalni antimikotik flukonazol. Prema pregledu literature, nema ranije objavljenih podataka o antibiofilm potencijalu vrsta iz roda *Anthriscus*.

Rezultati dobijeni proučavanjem antibiofilm potencijala ekstrakta biljke *O. spinosa* na formirani biofilm *C. albicans*, *C. krusei* i *C. tropicalis* (**Tabela 10**) ukazuju na značajan antibiofilm potencijal ispitivanog ekstrakta.

Tabela 10. Aktivnost metanolnih ekstrakata i referentnog jedinjenja flukonazola na formiran biofilm sojeva *Candida* (MIKB i MFKB, mg/mL).

Kvasci	<i>A. cerefolium</i>		<i>O. spinosa</i>		<i>P. fruticosa</i>		Flukonazol	
	MIKB	MFKB	MIKB	MFKB	MIKB	MFKB	MIKB	MFKB
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	5,00	10,00	5,00	10,00	2,50	5,00	8,00	9,00
<i>C. krusei</i> (klinički izolat)	5,00	10,00	2,50	5,00	2,50	5,00	2,00	3,00
<i>C. tropicalis</i> (ATCC 750)	5,00	10,00	5,00	10,00	5,00	10,00	3,00	6,00

Vrednosti MIKB i MFKB za ekstrakt *O. spinosa* bile su više u poređenju sa vrednostima MIK i MFK dobijenim pri analizi antifungalne aktivnosti primenom mikrodilucionog testa (**Tabela 8**). Biofilm koji formira *C. krusei* bio je podložniji dejstvu *O. spinosa* ekstrakta u poređenju sa biofilmom koji formiraju *C. albicans* i *C. tropicalis*. Takođe, rezultati za aktivnost ekstrakta *O. spinosa* (MIKB 2,5 mg/mL; MFKB 5 mg/mL) na formirani biofilm *C. krusei*, su poredivi sa vrednostima dobijenim za komercijalni antifungalni lek flukonazol (MIKB 2 mg/mL; MFKB 3 mg/mL), što otvara mogućnosti korišćenja ekstrakata zečjeg trna u tretmanu oboljenja uzrokovanih ovim patogenom. Pored toga, MIKB vrednost ekstrakta *O. spinosa* (5 mg/mL) na formirani biofilm *C. albicans*

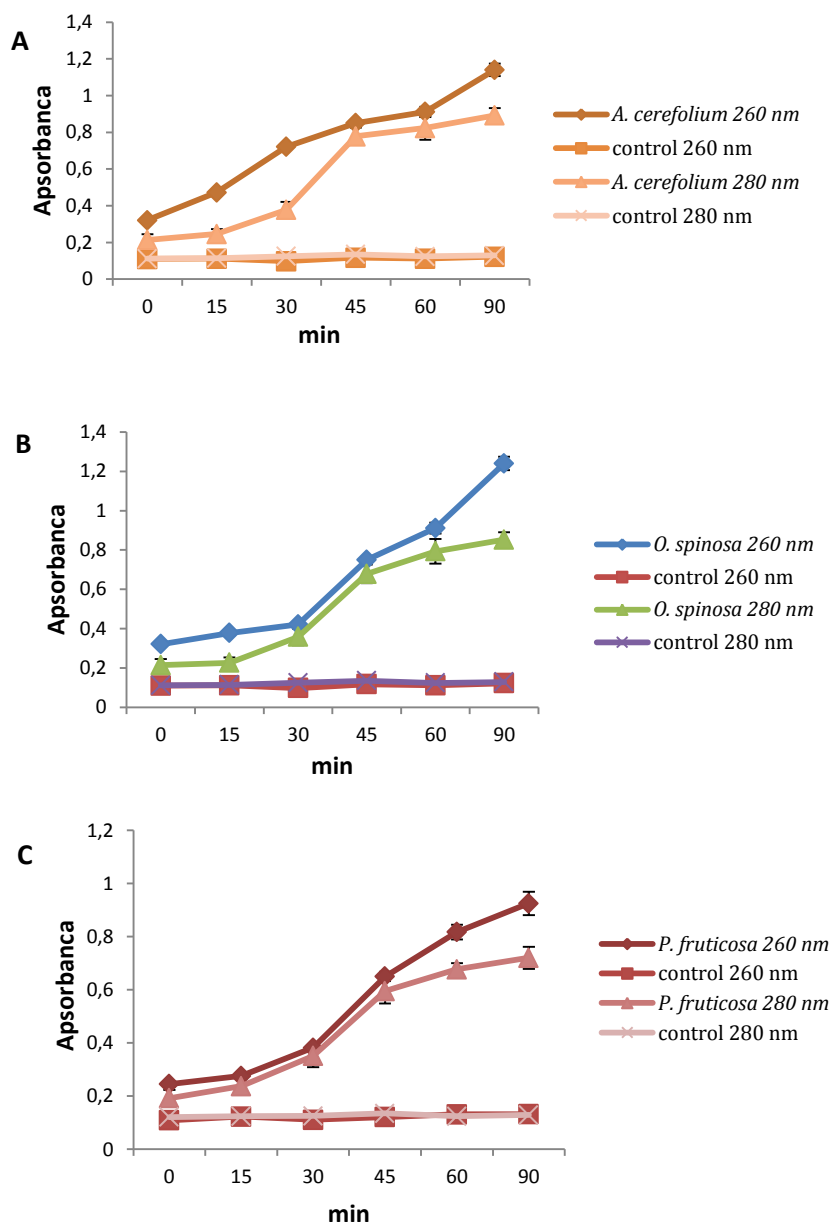
je bila niža u poređenju sa MIKB vrednošću flukonazola (8 mg/mL). Koliko je poznato, dobijeni rezultati predstavljaju prve rezultate o antibiofilm aktivnosti ekstrakta *O. spinosa*.

Antibiofilm aktivnost metanolnog ekstrakta *P. fruticosa* je testirana na istim sojevima kao i za ekstrakt *O. spinosa*: *C. albicans*, *C. krusei* i *C. tropicalis* (**Tabela 10**). Dobijeni rezultati su pokazali da je patogen *C. albicans* otporniji na dejstvo ekstrakta *P. fruticosa* kada je u formi biofilma u poređenju sa rezultatima dobijenim prilikom analize antifungalne aktivnosti primenom mikrodilucione metode (**Tabela 9**). Vrednosti MIKB i MFKB bile su oko 4 puta veće za biofilm *C. albicans* u poređenju sa onima dobijenim primenom mikrodilucione metode (**Tabela 9**). Sličan efekat ekstrakta detektovan je i za *C. krusei* i *C. tropicalis*. Dobijeni rezultati su ukazali da je aktivnost ekstrakta *P. fruticosa* na formirani biofilm *C. albicans* veća (MIKB 2,5 mg/mL; MFKB 5 mg/mL) u poređenju sa komercijalnim lekom flukonazolom (MIKB 8 mg/mL; MFKB 9 mg/mL). Pregled literature je pokazao da je ovo prvo istraživanje antibiofilm aktivnosti ekstrakta *P. fruticosa*.

Dobijeni rezultati su od velikog značaja jer je broj imunokompromitovanih pacijenata sa združenim gljivičnim infekcijama čiji je uzročnik *Candida* spp. u porastu.

4.3.2 Analiza efekata ekstrakata na integritet ćelijske membrane kvasca *C. albicans*

Rezultati analize efekata metanolnih ekstrakata testiranih biljaka na integritet ćelijske membrane *C. albicans* su prikazani na **Slici 22**. Dobijeni rezultati su pokazali da sva tri metanolna ekstrakta narušavaju integritet ćelijske membrane kvasca *C. albicans* dovodeći do oslobađanja intracelularnih komponenti ćelija *C. albicans* (nukleotida, proteina) u ekstracelularni medijum. Pored toga, uočeno je da sva tri ekstrakta ispoljavaju vremenski zavisani efekat na permeabilnost ćelijske membrane. Dobijeni rezultati ukazuju da je jedan od mehanizama kojim metanolni ekstrakti testiranih biljaka ostvaruju antifungalni potencijal preko efekta na permeabilnost ćelijske membrane kvasca.

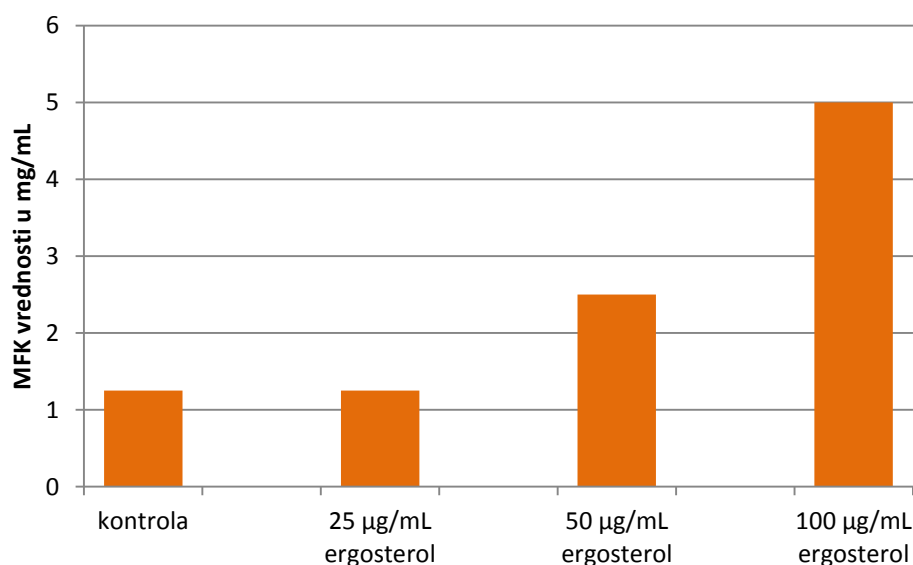


Slika 22. Efekat metanolnih ekstrakata na permeabilnost ćelijske membrane kvasca *C. albicans*. **A)** dejstvo ekstrakta *A. cerefolium*, **B)** dejstvo ekstrakta *O. spinosa* i **C)** dejstvo ekstrakta *P. fruticosa*.

4.3.3 Analiza efekata ekstrakata na ergosterol kod *C. albicans*

Razlike u eukariotskoj strukturi ćelija gljiva u odnosu na humane ćelije predstavljaju značajna ciljna mesta za razvoj novih antifungalnih lekova [146], a jedna od najvažnijih meta pri njihovoj formulaciji su enzimi uključeni u put biosinteze ergosterola [147], molekula pronađenog u ćelijskoj membrani gljiva koji je značajan za njihovo preživljavanje [147]. Osim što deluju na biosintetski put ergosterola, dokazano je da neki antifungalni proizvodi imaju moć da prodru u ćelije gljiva i naruše strukturu ćelijske membrane gljiva, bogate nezasićenim masnim kiselinama, što dovodi do reorganizacije u sastavu membrane, gubitka vitalnosti ćelije i, na kraju, smrti ćelija [148].

U ovoj doktorskoj disertaciji je proučavana stopa preživljavanja *C. albicans* u prisustvu eksterno dodatih rastućih koncentracija ergosterola (25-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) i serijskih razblaženja ekstrakata *A. cerefolium*, *O. spinosa* i *P. fruticosa*, kako bi se utvrdilo da li ekstrakti ostvaruju antifungalni efekat narušavanjem biosintetskog puta ergosterola. Dobijeni rezultati su pokazali da je ekstrakt *O. spinosa* jedini uticao na biosintetski put ergosterola (**Slika 23**). Detektovano je da se vrednosti MFK povećavaju sa povećanjem koncentracije eksterno dodatog ergosterola. Ovi rezultati ukazuju da u prisustvu ekstrakta *O. spinosa* dolazi do narušavanja biosintetičkog puta ergosterola. Efekat metanolnih ekstrakata biljaka *A. cerefolium* i *P. fruticosa* na biosintetski put ergosterola nije uočen primenom ovog testa, tj. vrednost MFK za oba ekstrakta je ostala nepromenjena sa dodatkom ergosterola.

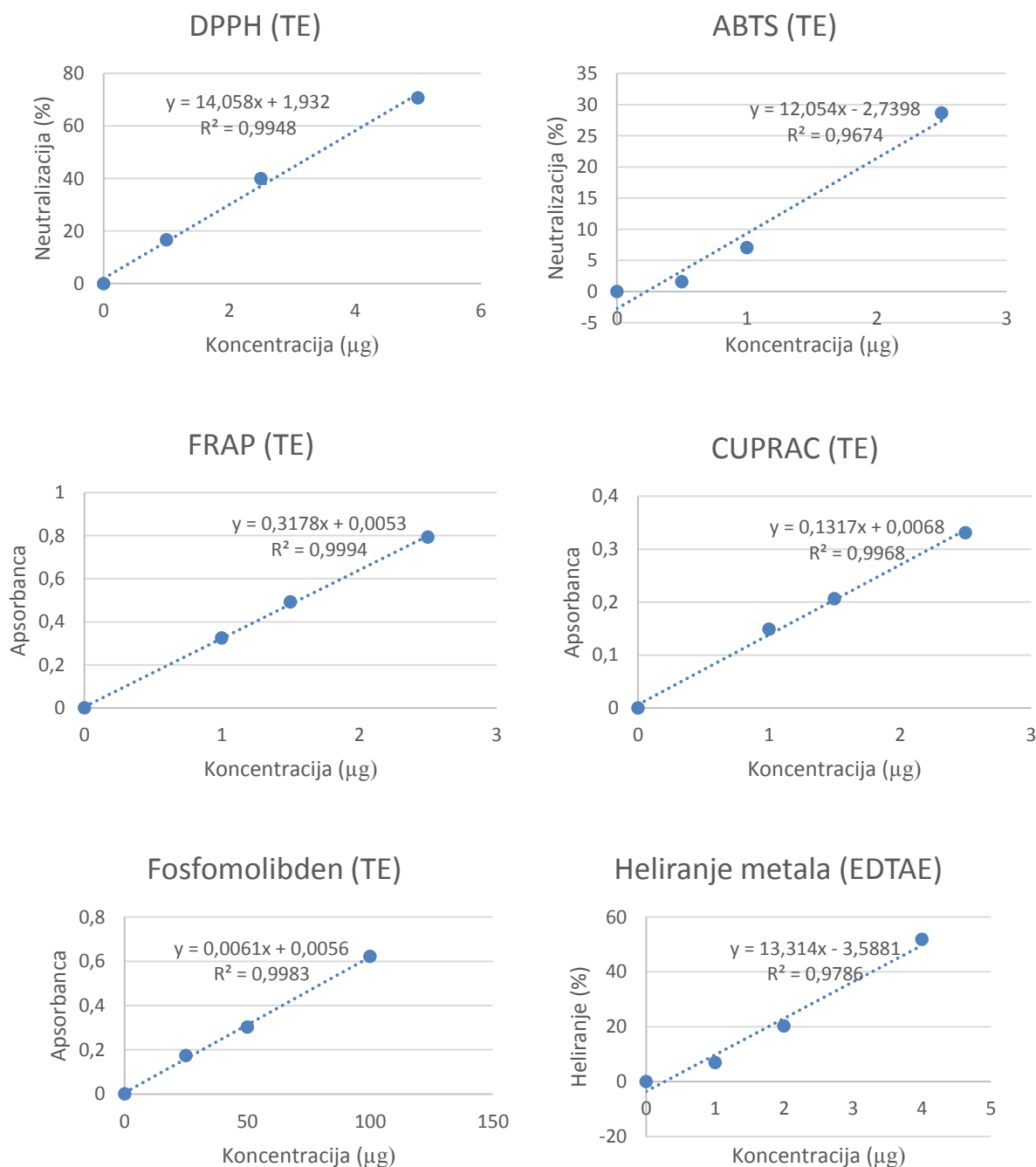


Slika 23. Minimalne fungicidne koncentracije metanolnog ekstrakta *O. spinosa* kod *C. albicans* u prisustvu različitih koncentracija ergosterola.

Dobijeni rezultati ukazuju da metanolni ekstrakt *O. spinosa* ima značajan potencijal za formulaciju novih antifungalnih lekova jer je mogućnost razvoja otpornosti gljiva na ovaj ekstrakt mala imajući u vidu da ovaj ekstrakt ispoljava antifungalnu aktivnost delujući preko različitih mehanizama, utičući na integritet ćelijske membrane *C. albicans*, kao i na biosintetski put ergosterola.

4.4 Antioksidativna aktivnost ekstrakata

Antioksidativna svojstva metanolnih ekstrakta *A. cerefolium*, *O. spinosa* i *P. fruticosa* ispitana su korišćenjem šest različitih testova i dobijeni rezultati su pokazali da svi testirani ekstrakti imaju antioksidativna svojstva (Tabela 11). U cilju određivanja antioksidativnog kapaciteta ekstrakata, napravljene su kalibracione krive za svaki od šest testova i prikazane su na Slici 24.



Slika 24. Kalibracione krive za svaki test (DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC, Fosfomolibden i test sposobnosti heliranja jona metala) za određivanje antioksidativnog potencijala ekstrakata kao ekvivalenta standardnih antioksidanasa.

Antioksidativni kapacitet metanolnog ekstrakta biljke *A. cerefolium* je prikazan u **Tabeli 11**. Ovim testovima (DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC, Fosfomolibden i test sposobnosti heliranja jona metala) je pokazano da metanolni ekstrakt biljke poseduje aktivnost za neutralizaciju slobodnih radikala, redukcione sposobnosti i sposobnost heliranja jona metala. Antioksidativno dejstvo hidroetanolnog ekstrakata dobijenog iz nadzemnih delova vrste *A. cerefolium* mereno je takođe DPPH testom, FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma), NSSOH (Nonsite-specific hydroxyl radical-mediated 2-deoxy-d-ribose degradation) i SSOH (Site-specific hydroxyl radical-mediated 2-deoxy-d-ribose degradation) metodom, pri čemu je ekstrakt pokazao slab potencijal [74].

Detaljan prikaz antioksidativnih svojstava metanolnog ekstrakta *O. spinosa* prikazan je u **Tabeli 11**. Antioksidativni efekat je pokazan u testu sa fosfomolibdenom (1,50 mmol TE/g ekstrakta), a rezultati su takođe pokazali i da ekstrakt ima aktivnost neutralizacije radikala u DPPH (23,96 mg TE/g ekstrakta) i ABTS testu (61,29 mg TE/g ekstrakta) kao i redukcionu sposobnost u CUPRAC (101,44 mg TE/g ekstrakta) i FRAP testu (59,61 mg TE /g ekstrakta). Pored toga, pokazano je da ekstrakt ima dobru sposobnost heliranja jona metala (**Tabela 11**). Prethodno publikovani podaci su u skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji i ukazuju da metanolni ekstrakt dobijen iz nadzemnih delova *O. spinosa* subsp. *leiosperma* ima aktivnost neutralizacije radikala detektovanu primenom DPPH (117,29 µg/mL) i ABTS (127,25 µg/mL) testa [27]. Takođe, isti autori su pokazali da etanolni ekstrakt (70%) *Ononidis herba* inhibira formiranje superoksid anjona sa IC₅₀ koncentracijom 1,35 mg/mL, kao i da je je manje aktivan u testu peroksidacije lipida (IC₅₀ vrednost nije određena).

Tabela 11. Antioksidativni potencijal metanolnih ekstrakata testiranih vrsta.

Test	<i>A. cerefolium</i>	<i>O. spinosa</i>	<i>P. fruticosa</i>
Fosfomolibden (mmol TE/g ekstrakta)	0,93±0,01	1,50±0,11	1,22±0,04
DPPH (mg TE/g ekstrakta)	17,76±1,33	23,96±0,97	39,30±0,87
ABTS (mg TE/g ekstrakta)	34,61±0,31	61,29±0,82	54,62±0,79
CUPRAC (mg TE/g ekstrakta)	75,37±1,03	101,44±1,05	123,44±1,35
FRAP (mg TE/g ekstrakta)	40,83±0,60	59,61±0,87	71,17±0,69
Metal helirajuća aktivnost (mg EDTAE/g ekstrakta)	18,01±0,49	7,55±0,72	13,16±1,95

Rezultati analize antioksidativnog potencijala *P. fruticosa* su pokazali da ovaj ekstrakt poseduje sposobnost neutralizacije slobodnih radikala detektovanu primenom DPPH testa (39,3 mg TE/g ekstrakta), dok je primenom ABTS testa, ova vrednost bila nešto viša (54,62 mg TE/g ekstrakta) (**Tabela 11**). Antioksidativna aktivnost ekstrakta *P.*

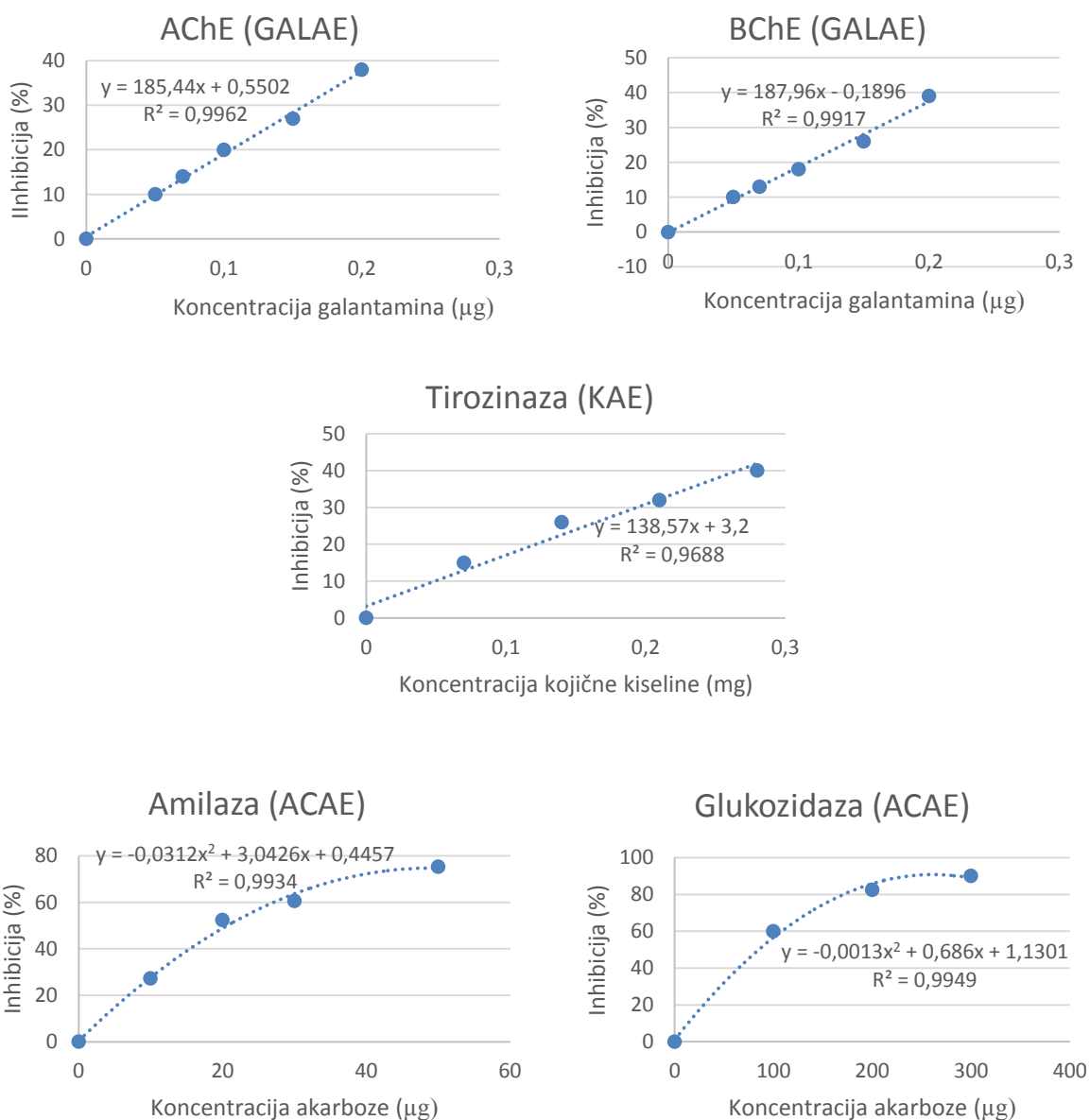
fruticosa prethodno je detektovana korišćenjem vodenih, hidroalkoholnih i alkoholnih ekstrakata ove biljke od strane Ferrante i saradnika [149]. Ukupni antioksidativni kapacitet ekstrakta *P. fruticosa* određen metodom sa fosfomolibdatom bio je 1,22 mmol TE/g ekstrakta, dok je redukcion kapacitet ekstrakta određen CUPRAC i FRAP testovima iznosio 123,44 mg TE/g ekstrakta i 71,17 mg TE/g ekstrakta, redom. Prethodna studija na metanolnom ekstraktu *P. armeniaca* [150] utvrdila je njegovu antioksidativnu aktivnost primenom CUPRAC testa od 127,60 mg TE/g ekstrakta i FRAP testa na 87,08 mg TE/g ekstrakta, što je nešto više u poređenju sa dobijenim vrednostima u ovoj doktorskoj disertaciji (Tabela 11). Sposobnost heliranja jona metala od strane ekstrakta *P. fruticosa* određena je na 13,16 mg EDTAE/g ekstrakta. Prethodno objavljeni rezultati su pokazali da metanolni ekstrakt *P. armeniaca* ispoljava helirajući efekat (20,40 mg EDTAE/g ekstrakta) [150], kao i *P. nissolii* (17,01 mg EDTAE/g ekstrakta), i *P. pungens* var. *pungens* ekstrakt (21,08 mg EDTAE/g ekstrakta) [151], što ukazuje na niži helirajući efekat metanolnog ekstrakta *P. fruticosa*.

Uporedna analiza vrednosti dobijenih za analizirane ekstrakte pri primeni testova za određivanje antioksidativne aktivnosti ukazuje da najbolji antioksidativni potencijal ima metanolni ekstrakt *P. fruticosa*. U DPPH, CUPRAC i FRAP testovima, najbolje vrednosti su dobijene za metanolni ekstrakt *P. fruticosa*, dok se u ABTS testu i testu sa fosfomolibdatom kao najbolji pokazao ekstrakt *O. spinosa*. U testu heliranja metala, najbolje vrednosti su dobijene za metanolni ekstrakt *A. cerefolium*.

4.5 Enzim-inhibitorna aktivnost ekstrakata

Produženje životnog veka i porast broja populacije starijeg uzrasnog doba širom sveta, dovelo je i do povećanja broja pacijenata sa neurodegenerativnim oboljenjima, uključujući i one koji boluju od Alchajmerove (AD) i Parkinsonove bolesti [152]. Trenutna terapijska strategija za AD uključuje primenu lekova, kao što su inhibitori acetilholinesteraze: donepezil, rivastigmin, galantamin i dr., koji odlažu progresiju bolesti lečenjem simptoma, a ne njenog uzroka [153]. Istovremeno, inhibitori enzima butirilholinesteraze, koji hidrolizuje acetilholin, intenzivno se proučavaju kao neizostavni delovi terapijskih strategija u AD [154]. Sa druge strane, tirozinaza je ključni enzim u biosintezi melanina, sa određenom ulogom kod neurodegenerativnih bolesti [155], pa je ispitivanje tirozinazne aktivnosti od značaja. Pored niza poremećaja aktivnosti enzima povezanih sa razvojem neurodegenerativnih bolesti, još jedan poremećaj u radu enzima ključnih za metabolizam šećera u krvi je u vezi sa oboljenjem koje je poslednjih decenija postiglo epidemiološke srazmere – dijabetesom [156]. Preciznije, *diabetes mellitus* spada u hronične metaboličke poremećaje koji se indukuje povećanjem koncentracije glukoze u krvi usled nedostatka insulina, insulinske rezistencije ili poremećaja funkcionisanja β ćelija pankreasa [157]. U Sjedinjenim Američkim Državama, broj ljudi koji boluju od dijabetesa dostiže 23 miliona, sa mnogo većom učestalošću dijabetesa tipa 2 [158], dok je u Srbiji procenjeno da će broj obolelih od dijabetesa biti 12,2% od ukupne populacije do 2040. godine [159]. U Indiji je procenat smrtnih slučajeva uzrokovanih dijabetesom porastao sa 0,98% u 1990. na 3,1% svih smrtnih slučajeva u 2016. godini [157]. Inhibitori enzima amilaze i glukozidaze, kao što je akarboza, se koriste u tretmanu dijabetesa tipa II, a u ovom aspektu se prirodni proizvodi ponovo ističu kao nezamenljiv izvor inhibitora enzima i potencijalnih terapeutika [160].

Imajući u vidu značaj određenih enzima u razvoju i etiologiji gore pomenutih oboljenja čija je učestalost značajno povećana poslednjih godina, jedan od specifičnih ciljeva ove doktorske disertacije je bio i ispitivanje efekta metanolnih ekstrakata biljaka na ključne enzime koji se dovode u vezu sa ovim poremećajima: AChE, BChE, tirozinaze, amilaze i glukozidaze. U cilju ispitivanja efekata ekstrakta na svaki enzim ponaosob generisane su kalibracione krive (**Slika 25**).



Slika 25. Kalibracione krive za testirane enzime

Metanolni ekstrakt biljke *A. cerefolium* je posedovao inhibitornu aktivnost na sve testirane enzime, izuzev glukozidaze gde efekat testiranog ekstrakta na aktivnost ovog enzima nije detektovan (**Tabela 12**). Ekstrakt je imao najizraženiju aktivnost na enzim tirozinazu (131,49 mg KAE/g ekstrakta). Pregled literaturnih podataka je pokazao da ne postoje prethodne analize enzim-inhibitornog potencijala metanolnog ekstrakta biljke *A. cerefolium*.

Rezultati određivanja enzimskih inhibitornih koncentracija metanolnog ekstrakta *O. spinosa* su prikazani u **Tabeli 12** i ukazuju na inhibitornu aktivnost zečjeg trna na sve ispitivane enzime. Ekstrakt je ispoljio inhibitorni efekat na amilazu (0,76 mmol ACAE/g ekstrakta); glukozidazu (1,56 mmol ACAE/g ekstrakta), ali je bio aktivan i spram BChE i AChE, što se može dovesti u vezu sa terapeutcima koji se koriste za terapiju AD. Najizraženija inhibitorna aktivnost ekstrakta *O. spinosa* detektovana je za tirozinazu, dok

rezultati dobijeni za amilazu i glukozidazu sugerišu da je testirani ekstrakt perspektivan kandidat u razvoju lekova za dijabetes tipa 2. Da su ekstrakti zečjeg trna perspektivni enzim-inhibitorni agensi, pokazale su i studije Addotey i saradnika [85] i Ergene Oz i saradnika [27] u kojima su ekstrakti korena *O. spinosa* inhibirali aktivnost enzima hijaluronidaze-1, što se dovodi u vezu sa poboljšanom regeneracijom tkiva i zarastanjem rana. Uz to, utvrđeno je i da metanolni ekstrakt *O. spinosa* deluje inhibitorno i protiv citosolne fosfolipaze A2a (IC₅₀ 39,4 µg/mL), što je značajno pri tretmanu inflamatornih procesa koji prate alergijske reakcije, astmu i artritis [161].

Tabela 12. Enzim-inhibitorna aktivnost metanolnih ekstrakata testiranih biljaka.

Enzim-inhibitorna aktivnost	<i>A. cerefolium</i>	<i>O. spinosa</i>	<i>P. fruticosa</i>
AChE inhibicija (mg GALAE/g ekstrakta)	3,68±0,10	3,55±0,12	3,45±0,27
BChE inhibicija (mg GALAE/g ekstrakta)	3,19±0,07	2,44±0,08	3,34±0,29
Amilazna inhibicija (mmol ACAE/g ekstrakta)	0,70±0,05	0,76±0,02	0,69±0,03
Glukozidazna inhibicija (mmol ACAE/g ekstrakta)	NE	1,56±0,01	NE
Tirozinazna inhibicija (mg KAE/g ekstrakta)	131,49±0,67	132,20±1,48	133,16±0,88

NE- Nema inhibitornog efekta.

Ekstrakt *P. fruticosa* je inhibitorno delovao na AChE (3,45 mgGALAE/g ekstrakta) i BChE (3,34 mgGALAE/g ekstrakta) što je prikazano u **Tabeli 12**. Iako nema publikovanih podataka koji se tiču aktivnosti *P. fruticosa* na AchE i BchE, postoje studije koje su utvrdile enzim-inhibitornu aktivnost drugih vrsta roda *Phlomis*. Tako, studija u kojoj je ispitan enzim-inhibitorni potencijal etarskog ulja *Phlomis kurdica* (250 µg/mL), je ukazala da ulje može umereno inhibirati i AChE i BChE [162]. S druge strane, etarska ulja *P. armeniaca*, *P. nissolii* i *P. pungens* var. *pungens* su bila aktivna protiv AChE sa 0,67, 1,09 i 1,23 mg GALAE/g ulja (redom), dok su u manjoj meri pokazali aktivnost i protiv BChE (vrednosti redom: 1,88, 3,03 i 2,52 mg GALAE/g ulja) [151]. Pored etarskih ulja, različiti ekstrakti *P. armeniaca* su takođe inhibirali aktivnost AChE (0,53-2,07 mg GALAE/g ekstrakta) i BChE (1,44-4,56 mg GALAEs/g ekstrakta) [150]. Slično je uočeno i za ekstrakte *P. nissolii* (AChE, 0,47- 2,08 mg GALAEs/g ekstrakta, BChE 2,11- 3,25 mg GALAE/g ekstrakta) i *P. pungens* var. *pungens* (AchE: 0,48-2,21 mg GALAE/g ekstrakta, BchE: 2,02-5,68 mg GALAEs/g ekstrakta) [151]. Rezultati istraživanja prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji su pokazali da testirani ekstrakt poseduje i značajnu inhibitornu aktivnost na tirozinazu - 133,16 mg KAE/g ekstrakta, što je i ranije potvrđeno za neke vrste roda *Phlomis*: za metanolni ekstrakt *P. caucasica* (IC₅₀ 1,2 mg/mL), [163]; za etarsko ulje *P. armeniaca* (66,72 mg KAE/g ulja), [164]; za ekstrakte *P. armeniaca* (9,88-15,97 mg KAE/g ekstrakta), [150]; za etarsko

ulje *P. nissolii* (63,30 mg KAE/g ulja), [164]; za ekstrakte *P. nissolii* (2,00-14,21 mg KAE/g ekstrakta), [151]; za etarsko ulje *P. pungens* var. *pungens* (86,30 mg KAE/g ulja), [164] i ekstrakte *P. pungens* var. *pungens* (7,84-29,56 mg KAE/g ekstrakta), [151]. U ovom radu su ispitivani i inhibitorni efekti ekstrakta *P. fruticosa* na enzime α -amilazu i α -glukozidazu. Rezultati su pokazali da ekstrakt inhibira aktivnost α -amilaze na 0,69 mmol ACAE/g ekstrakta, dok nema efekta na aktivnost α -glukozidaze (**Tabela 12**). Pregled literaturnih podataka je ukazao da istraživanje predstavljeno u ovoj doktorskoj disertaciji predstavlja prvu studiju o inhibitornoj aktivnosti metanolnog ekstrakta *P. fruticosa* na enzime AChE, BChE, tirozinazu i amilazu. Takođe, testirani ekstrakt je ima sličnu inhibitornu aktivnost na holinesterazu kao i prethodno testirane vrste roda *Phlomis*, dok je sa druge strane pokazao veći inhibitorni potencijal za enzim tirozinazu [150,151,164].

Uporedna analiza rezultata dobijenih za sva tri ekstrakta, ukazuje da najizraženiji enzim-inhibitorni potencijal ima ekstrakt biljke *O. spinosa*, jer deluje inhibitorno na sve testirane enzime; najbolje inhibira enzim amilazu i jedini inhibira glukozidazu. Najbolju inhibitornu aktivnost na AChE je ispoljio ekstrakt biljke *A. cerefolium*, dok je najbolju inhibitornu aktivnost na BChE i tirozinazu pokazao metanolni ekstrakt *P. fruticosa*.

4.6 Analiza antiproliferativne aktivnosti ispitivanih ekstrakata

Literaturni podaci ukazuju da su maligna oboljenja vodeći uzrok smrtnosti u zemljama sa visokim prihodima [165]. Pored toga, GLOBOCAN (*eng.* Global Cancer Statistics) je procenio 19,292,789 novih slučajeva i 9,958,133 smrtnih slučajeva od malignih oboljenja u 2020. godini [166]. Imajući u vidu kontinuiran porast malignih oboljenja kao i nedostatak adekvatnih, sigurnih i efikasnih terapija u tretmanu istih, potrebno je ispitati što veći broj supstanci kako bi se pronašli mogući novi terapijski pristupi za ova oboljenja.

Citotoksičnost metanolnih ekstrakata ispitivanih biljaka, odnosno njihov antiproliferativni efekat je najpre analiziran na ne-tumorskim ćelijama, primarnoj ćelijskoj liniji humanih gingivalnih fibroblasta (HGF-1) i imortalizovanoj ćelijskoj liniji keratinocita kože (HaCaT).

Dobijeni rezultati, predstavljeni u **Tabeli 13** su pokazali da nijedan od testiranih biljnih ekstrakata nije ispoljio citotoksičnost na HGF-1 ćelije pri koncentracijama manjim od 800 µg/ml. Takođe, ekstrakti *A. cerefolium* i *P. fruticosa* nisu ispoljili citotoksičnost na HaCaT ćelije, dok je ekstrakt *O. spinosa* pokazao umerenu citotoksičnost na ove ćelije.

Tabela 13. Antiproliferativni efekat metanolnih ekstrakata testiranih biljaka.

Ćelijske linije	<i>A. cerefolium</i> IC ₅₀ (µg/mL)	<i>O. spinosa</i> IC ₅₀ (µg/mL)	<i>P. fruticosa</i> IC ₅₀ (µg/mL)
HGF-1	>800	>800	>800
HaCaT	478,65±25,55	144,92±26,53	429,91±31,65
A172	765,21±56,70	150,22±25,98	710,83±63,36
MCF7	394,31±86,54	101,28±8,29	453,97±108,41
SiHa	812,89±40,55	181,96±28,37	756,94±104,07
HepG2	1092,37±218,26	152,36±15,29	643,49±108,51

Antiproliferativni efekat ekstrakata je analiziran na četiri različite tumorske ćelijske linije, ćelijskoj liniji glioblastoma A172, ćelijskoj liniji cervikalnog karcinoma SiHa, ćelijskoj liniji karcinoma dojke MCF7 i ćelijskoj liniji humanog hepatocelularnog karcinoma HepG2.

Vrednost koncentracije ekstrakta *A. cerefolium* potrebna za 50% inhibicije rasta (IC₅₀) MCF7 ćelija je iznosila 394,31 µg/mL, dok je ovaj ekstrakt ispoljio najslabiju aktivnost na HepG2 ćelije, IC₅₀ 1092,37 µg/mL). Iako ne postoje literaturni podaci koji se odnose na aktivnost metanolnog ekstrakta ove biljke na ćelijske linije testirane u ovoj disertaciji, postoje publikovani podaci koji ukazuju da različiti ekstrakti/ulja krbuljice imaju umeren antiproliferativni potencijal. Prethodna istraživanja su pokazala da vodeni ekstrakt listova *A. sylvestris* nije ispoljio citotoksičnost na makrofage RAW264.7, ali je indukovao anti-

inflamatornu odbranu kod ovog ćelijskog modela [83]. Etarsko ulje dobijeno iz nadzemnih delova *A. caucalis* pokazalo je citotoksičnu aktivnost na HepG2 i MCF-7 ćelije [43]. Stoga, rezultati prikazani u ovom radu (**Tabela 13**) za *A. cerefolium* su u skladu sa prethodnim podacima, koji se odnose na citotoksične efekte ekstrakata biljaka ovog roda. Takođe, podaci predstavljeni u okviru ove disertacije predstavljaju prve podatke koje se odnose na analizu efekta metanolnog ekstrakta *A. cerefolium* na ćelijske linije cervikalnog karcinoma i glioblastoma.

Rezultati antiproliferativne aktivnosti metanolnog ekstrakta *O. spinosa* su pokazali da testirani ekstrakt ima dobar antiproliferativni potencijal na različitim tumorskim ćelijskim linijama (**Tabela 13**). Najsnažniji antiproliferativni efekat ekstrakta *O. spinosa* detektovan je na ćelijskoj liniji MCF7 (IC₅₀ 101,28 µg/mL), dok je najveća koncentracija (IC₅₀ 181,96 µg/mL) ekstrakta bila potrebna za antiproliferativni efekat na ćelijskoj liniji SiHa. Dodatno, na osnovu dobijenih rezultata ekstrakt se može klasifikovati kao umereno citotoksičan na sve ispitivane tumorske ćelijske linije. Prema dokumentima Evropske agencije za lekove, koren *O. spinosa* ima dokazana citotoksična svojstva [167].

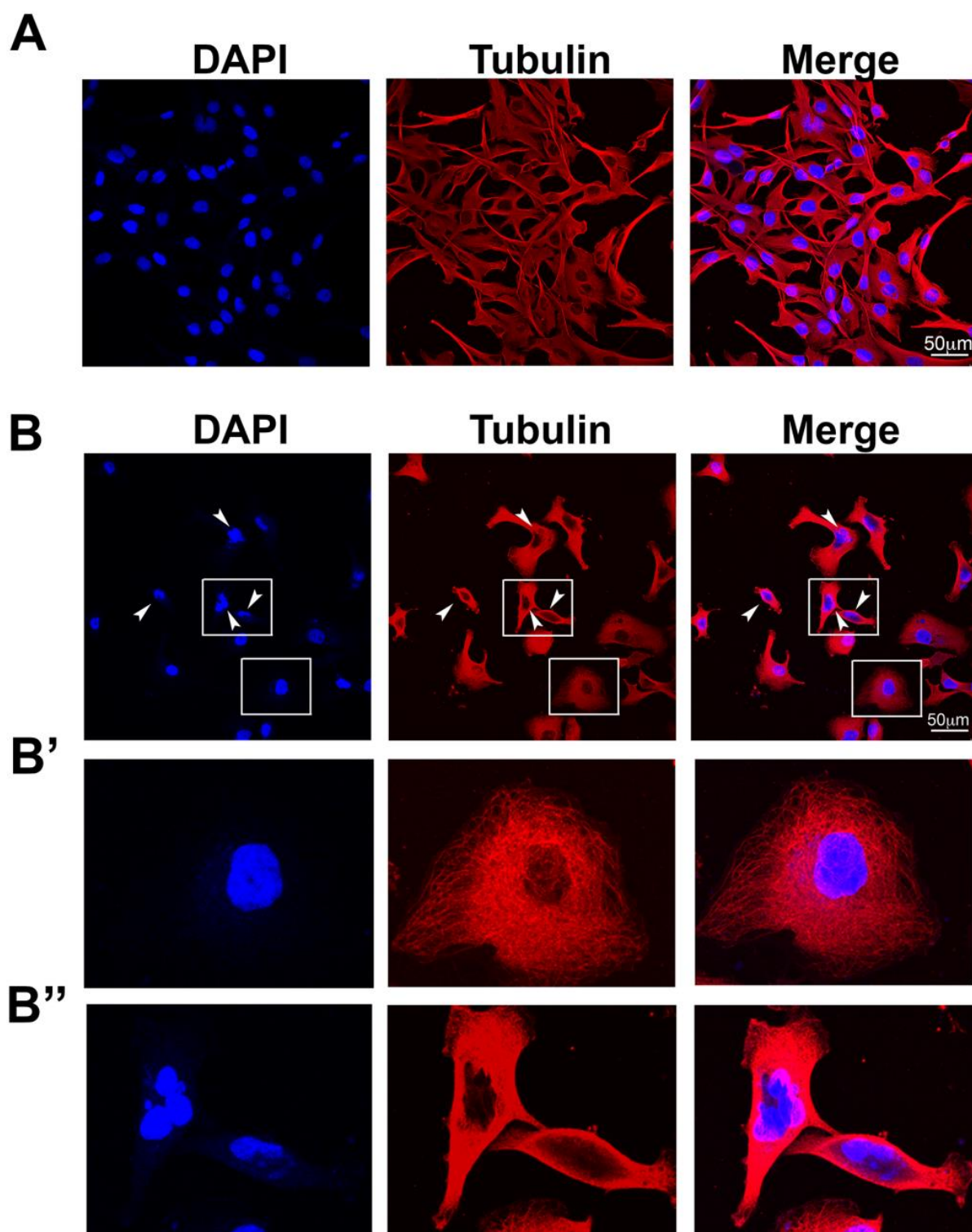
Rezultati analize antiproliferativnog efekta ekstrakta *P. fruticosa* pokazuju da ispitivani ekstrakt ispoljava slab antiproliferativni efekat na ispitivane tumorske ćelijske linije sa najizraženijim efektom na MCF-7 ćelije. Ovi rezultati ukazuju na slab antiproliferativni efekat testiranog ekstrakta. Prethodna istraživanja su ukazala na citotoksičnu aktivnost metanolnih ekstrakata *P. olivieri*, *P. caucasica*, *P. anisodonta*, *P. bruguieri*, *P. kurdica* i *P. persica* prema tumorskim ćelijskim linijama MCF-7, HepG2, HT29, A549 i MDBK [163]. Vrednosti IC₅₀ publikovane od strane ovih autora su u rangu rezultata koji su predstavljeni u ovoj disertaciji za vrstu *P. fruticosa*.

Poređenjem rezultata za sva tri ekstrakta, može se zaključiti da ekstrakti nisu pokazali citotoksičnost prema primarnim ćelijama HGF1, kao i da je metanolni ekstrakt *O. spinosa* imao najizraženiji antiproliferativni efekat prema svim analiziranim tumorskim ćelijskim linijama.

4.6.1 Analiza efekata ekstrakata na morfologiju A172 ćelija glioblastoma i na ekspresiju Ki67 markera proliferacije

Ispitivanje efekata ekstrakata na morfologiju malignih ćelija je značajno, s obzirom na to da promene u morfologiji ćelija ukazuju na citološke mehanizme delovanja antitumorskih agenasa [168]. Pored toga, neograničena i neregulisana sposobnost deobe je jedna od najznačajnijih osobina malignih [169,170] tako da je ispitivanje ekspresije Ki67 proteina, markera proliferacije, u A172 ćelijama glioblastoma tretiranim ispitivanim ekstraktima značajno sa stanovišta analize antiproliferativnog potencijala ispitivanih ekstrakata.

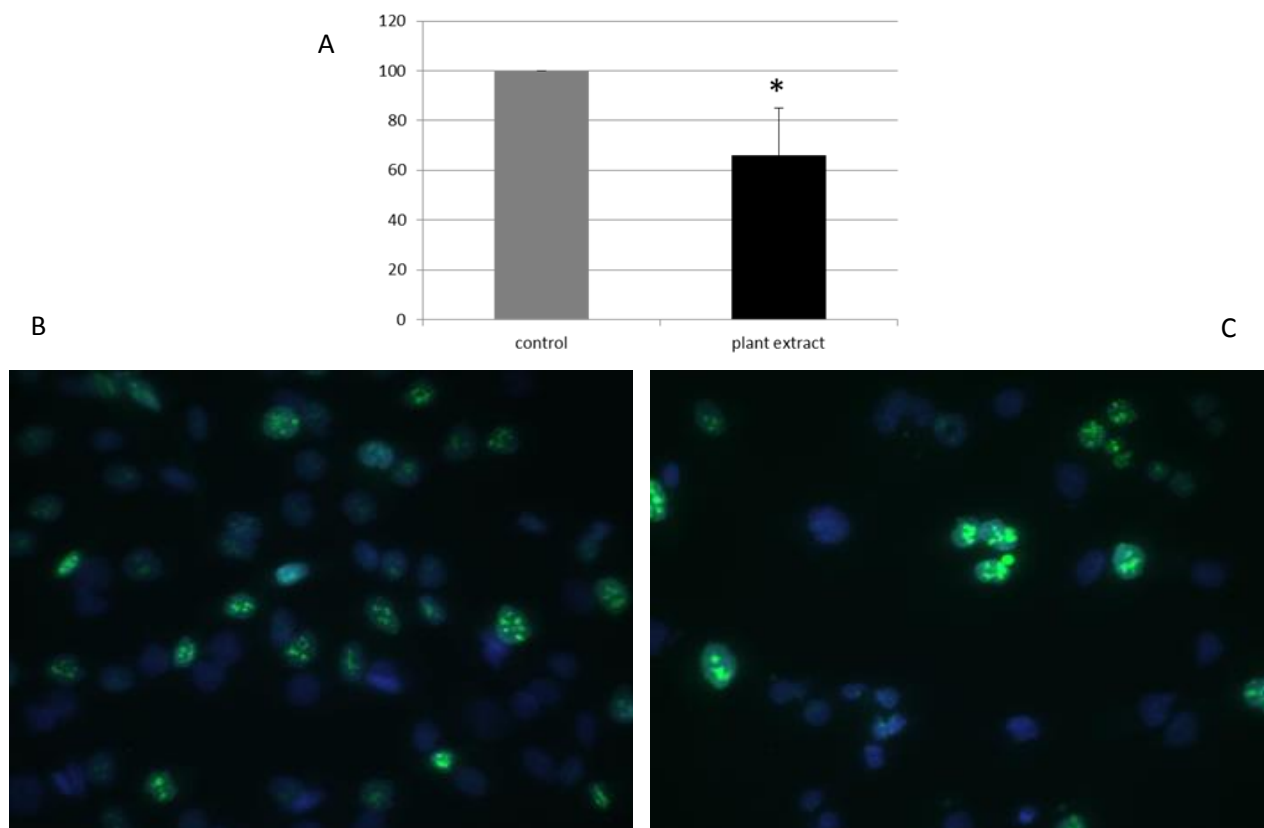
Morfologija A172 ćelija glioblastoma tretiranih DMSO-om (kontrola) ili metanolnim ekstraktom *A. cerefolium* (IC₅₀ koncentracija) proučavana je analizom ekspresije citoskeletnog proteina tubulina (**Slika 26**).



Slika 26. Morfologija kontrolnih ćelija A172 (A) i ćelija A172 tretiranih metanolnim ekstraktom *A. cerefolium* (B). Uokvireni regioni u B su uvećani na B' i B'' slikama. Strelice sa belim vrhovima u B poljima prikazuju ćelije sa mnogobrojnim mikronukleusuma.

Kao što je prikazano na **Slici 26A**, A172 ćelije tretirane DMSO-om pokazuju morfologiju karakterističnu za fibroblaste. Mreža mikrotubula je međusobno povezana i izgleda filamentozno (**Slika 26A**). Nasuprot tome, A172 ćelije tretirane metanolnim

ekstraktom *A. cerefoillum* (Slika 26B) ne ispoljavaju morfologiju karakterističnu za fioblaste; A172 ćelije tretirane ekstraktom su zaobljene i sa fragmentovanim jedrima. Kod ovih ćelija primećuje se difuzni obrazac bojenja tubulina, a neke od ćelije su sadržale i mnogobrojne mikronukleuse (vrhovi strelica na slici 26B). Morfološke promene detektovane kod A172 ćelija tretiranih ekstraktom *A. cerefoillum* su indikativne za procese zaustavljanja mitoze i ćelijsku smrt (apoptozu). Dalja istraživanja su neophodna kako bi se utvrdili mehanizmi preko kojih ispitivani ekstrakt dovodi do promene morfologije A172 ćelija.

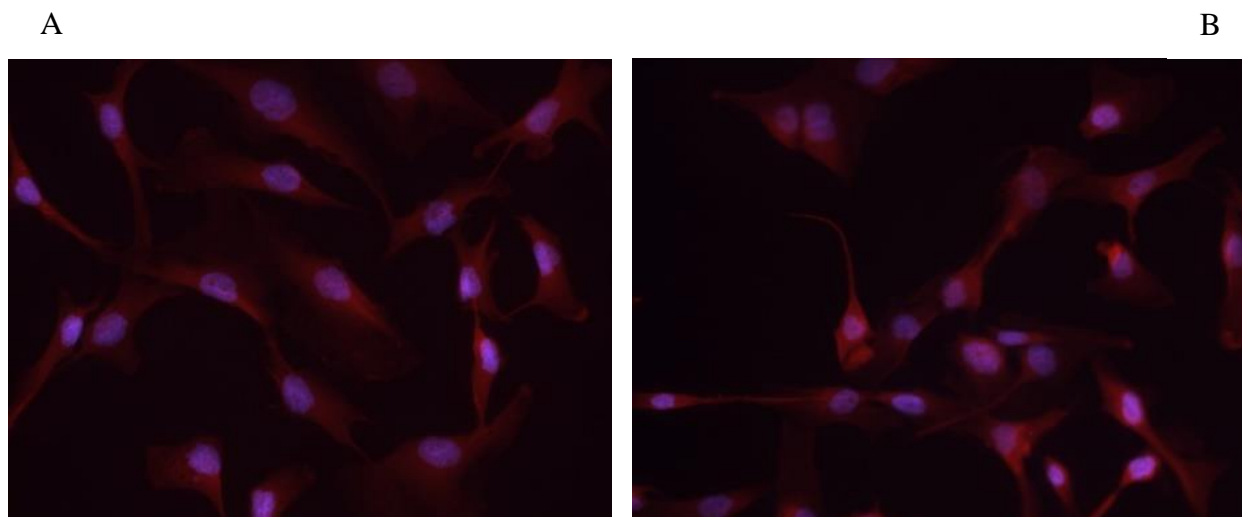


Slika 27. (A) Broj Ki67 pozitivnih ćelija u ćelijama tretiranim ekstraktom predstavljen je kao promena broja Ki67 pozitivnih ćelija u ćelijama tretiranim nosačem (DMSO); (B i C) Reprerzentativne slike imunocitohemijskog bojenja primenom antitela specifičnog za Ki67 protein (zeleno) u kontrolnim ćelijama tretiranim rastvaračem DMSO-om (B) i u ćelijama tretiranim ekstraktom (C). Jedra ćelija su obojena sa DAPI (plavo).

Uticaj ekstrakta *A. cerefoillum* na proliferaciju A172 ćelija proučavan je analizom ekspresije Ki67 proteina, markera proliferacije. Ki67 je dobro poznati marker za određivanje proliferacije tumora; njegova ekspresija se koristi kao prognostički marker proliferacije ćelija kod mnogih tumora i pokazano je da se na osnovu vrednosti Ki67 može predvideti odgovor na hemioterapiju [171]. Imunocitohemijskim bojenjem primenom antitela specifičnog za Ki67 protein otkriveno je da je stopa proliferacije A172 ćelija tretiranih ekstraktom smanjena za približno 30% u poređenju sa stopom proliferacije kontrolnih ćelija tretiranih DMSO-om (Slika 27). Ovi rezultati predstavljaju dobru osnovu za dalja istraživanja koja bi omogućila primenu ekstrakta *A. cerefoillum* u lečenju glioblastoma.

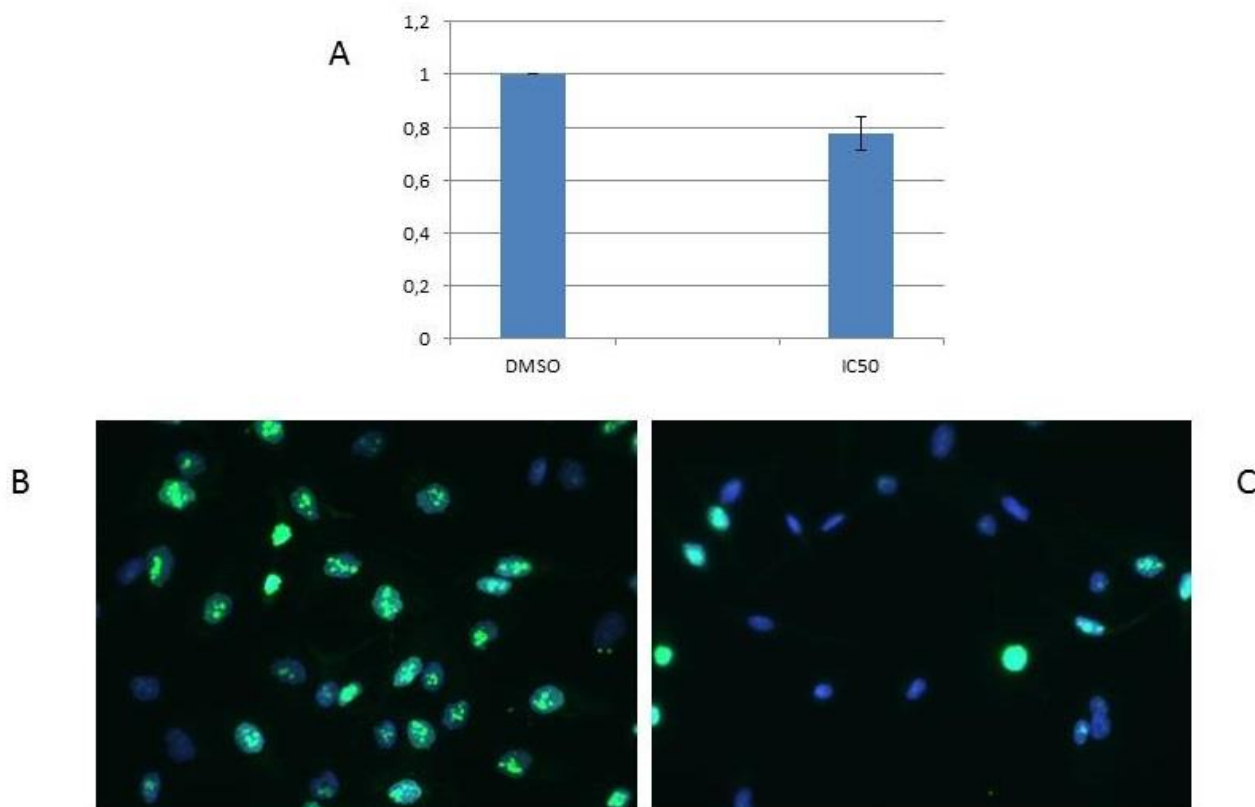
Takođe, rezultati predstavljeni u ovoj doktorskoj disertaciji predstavljaju prvu studiju o analizi efekta ekstrakta *A. cerefolium* na osobine ćelija glioblastoma.

Proučavanjem morfoloških karakteristika A172 ćelija glioblastoma tretiranih metanolnim ekstraktom *O. spinosa* analizom ekspresije citoskeletnog proteina tubulina, pokazalo je da ovaj ekstrakt u koncentraciji kojom inhibira 50% rasta A172 ćelija (IC₅₀) ne dovodi do promene morfologije ovih ćelija (**Slika 28**).



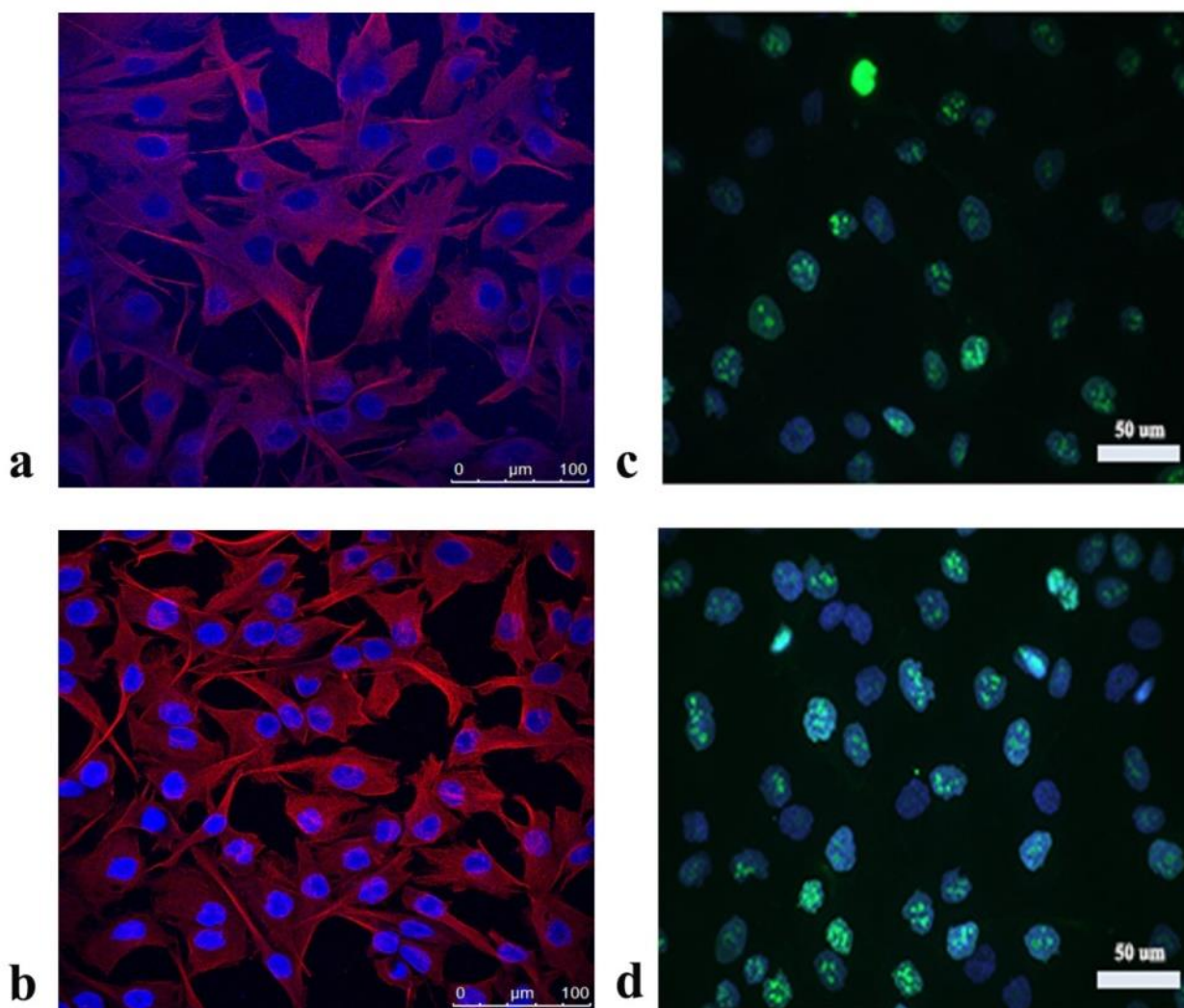
Slika 28. Reprezentativni primeri imunocitohemijskog bojenja kontrolnih A172 ćelija (**A**) i A172 ćelija tretiranih metanolnim ekstraktom *O. spinosa* (**B**) antitelom specifičnim za tubulin (crveno). Jedra ćelija su obojena sa DAPI (plavo).

Sa druge strane, imunocitohemijskim bojenjem primenom antitela specifičnog za Ki67 protein detektovano je da je stopa proliferacije A172 ćelija tretiranih ekstraktom smanjena za približno 20% u poređenju sa stopom proliferacije kontrolnih ćelija tretiranih DMSO-om (**Slika 29**).



Slika 29. Efekat metanolnog ekstrakta *O. spinosa* na proliferativni kapacitet A172 ćelija glioblastoma. (A) Relativni broj Ki67 pozitivnih ćelija kod A172 ćelija tretiranih ekstrakta *O. spinosa* izražen je kao stepen promene broja Ki67 pozitivnih kontrolnih ćelija (B); (B i C) Reprezentativne slike imunocitohemijskog bojenja primenom antitela specifičnog za Ki67 protein (zeleno) u kontrolnim ćelijama tretiranim rastvaračem DMSO-om (B) i u ćelijama tretiranim ekstraktom (C). Jedra ćelija su obojena sa DAPI (plavo).

Proučavanje morfoloških karakteristika A172 ćelije glioblastoma tretiranih metanolnim ekstraktom *P. fruticosa* analizom ekspresije citoskeletnog proteina tubulina, pokazalo je da ovaj ekstrakt u koncentraciji kojom inhibira 50% rasta A172 ćelija (IC₅₀) ne dovodi do promene morfologije ovih ćelija (Slika 30). Takođe, imunocitohemijskim bojenjem primenom antitela specifičnog za Ki67 protein nije detektovana razlika u broju Ki67 pozitivnih A172 kontrolnih ćelija i broju Ki67 pozitivnih A172 ćelija tretiranih ekstraktom (Slika 30), što ukazuje da metanolni ekstrakt *P. fruticosa* ne utiče na proliferativni kapacitet A172 ćelija glioblastoma.



Slika 30. Reprezentativni primeri imunocitohemijskog bojenja kontrolnih A172 ćelija (**b, d**) i A172 ćelija tretiranih metanolnim ekstraktom *P. fruticosa* (**a, c**) antitelom specifičnim za tubulin (**a, b**) (crveno) i Ki67 protein (**c, d**) (zeleno). Jedra ćelija su obojena sa DAPI (plavo).

Uporedna analiza rezultata za uticaj ekstrakata testiranih vrsta na morfologiju A172 ćelija i na ekspresiju proteina Ki67 je pokazala da je ekstrakt *A. cerefolium* uticao na morfološke promene i ujedno smanjio ekspresiju proteina Ki67. Ekstrakti dobijeni iz biljaka *O. spinosa* i *P. fruticosa* nisu pokazali uticaj na morfologiju A172 ćelija pri tretiranim koncentracijama. *O. spinosa* je smanjio ekspresiju proteina Ki67. Ovo je prvo istraživanje koje opisuje uticaj metanolnih ekstrakata *A. cerefolium*, *O. spinosa* i *P. fruticosa* na morfologiju ćelija A172 i na ekspresiju proteina Ki67.

4.7 Analiza anti-inflamatornog potencijala ekstrakata

U poslednjoj deceniji otkriveno je da keratinociti ne predstavljaju samo mehaničku barijeru, već da funkcionišu i kao imunokompetentne ćelije koje mogu da oslobađaju imunomodulirajuće citokine [172]. Pokazano je da IL-6 koji deluje kao medijator u inflamatornom procesu, poseduje veoma značajnu ulogu kako u razvoju tako i u metastaziranju različitih tipova malignih oboljenja, kao i drugih bolesti povezanih sa inflamacijom, kao što su reumatoidni artritis, inflamatorna bolest creva, infekcije i dr. [173–175]. Sa druge strane, interleukin IL-8 je povezan sa patogeneom kod inflamatornih bolesti kože [176].

U okviru ove doktorske disertacije, određeni su nivoi IL-6 i IL-8 u: (1) netretiranim HaCaT ćelijama, (2) HaCaT ćelijama inokulisanim sa *S. aureus*, (3) HaCaT ćelijama tretiranim ekstraktima (IC₂₅ koncentracijom) i inokulisanim sa *S. aureus*. Dobijeni rezultati su prikazani na u **Tabeli 14**.

Tabela 14. Anti-inflamatorni potencijal testiranih ekstrakata na modelu bakterijski posredovane inflamacije.

Uzorci	IL-6 (pg/mL)	IL-8 (pg/mL)
Kontrola	2,84±0,02	9,58±0,02
<i>S. aureus</i>	14,54±0,06	21,22±0,02
<i>S. aureus</i> + <i>A. cerefolium</i>	6,24±0,08	20,21±0,02
<i>S. aureus</i> + <i>O. spinosa</i>	9,54±0,04	19,83±0,02
<i>S. aureus</i> + <i>P. fruticosa</i>	4,12±0,02	11,45±0,02

Rezultati dobijeni u okviru ovog istraživanja pokazuju da nivoi IL-6 i IL-8 u humanim keratinocitima rastu nakon 4 h inkubacije ćelija sa bakterijom *S. aureus*, što ukazuje na porast upalnog procesa, koji prati bakterijsku infekciju. U slučaju ko-tretmana HaCaT ćelija sa bakterijom i ekstraktima, dolazi do smanjenja nivoa IL-6 i IL-8, što ukazuje da testirani ekstrakti imaju anti-inflamatorni potencijal kod zapaljenskih procesa koji prate infekciju bakterijom *S. aureus*. Najznačajniju anti-inflamatornu aktivnost u ovom test modelu pokazao je ekstrakt *P. fruticosa*, za koji se beleže približno isti nivoi ovih interleukina kao i u netretiranim kontrolnim ćelijama, što može imati praktičnu primenu u budućoj formulaciji medikamenata sa topikalnom primenom.

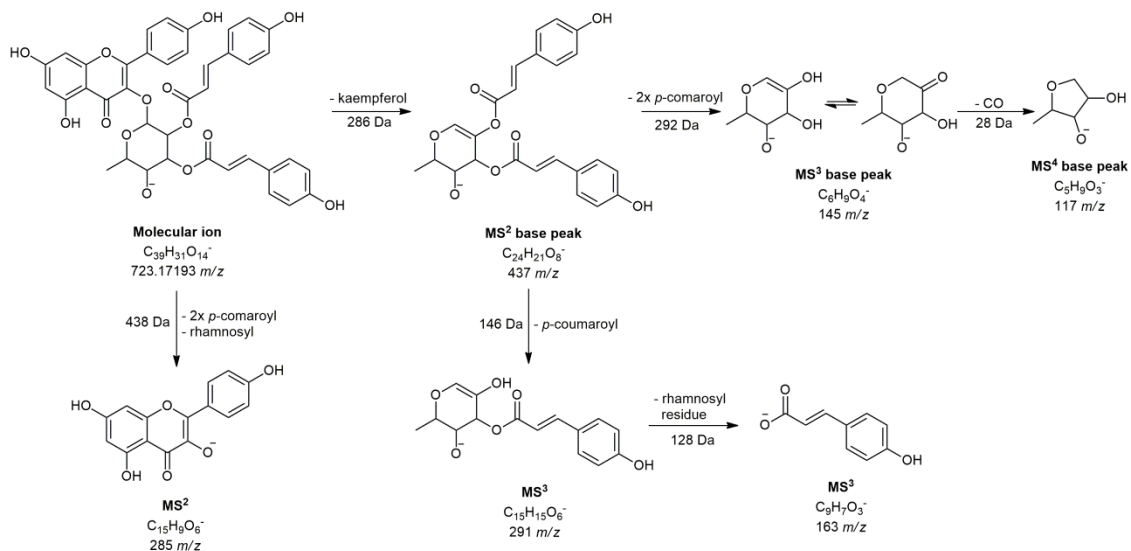
4.8 UHPLC-LTQ-Orbitrap/MS kvalitativna analiza i hemijski profil ekstrakata

Pregledom literature utvrđeno je da su hemijska jedinjenja slabo proučavana u biljnom materijalu *Anthriscus cerefolium*. U rodu *Anthriscus*, etarska ulja [43,44] i lignani [177] su najistraživanija grupa jedinjenja. U ovom radu je proučavan sadržaj fenolnih kiselina i derivata flavonoida u metanolnom ekstraktu *A. cerefolium*. Pošto ne postoje literaturni podaci o ovim hemijskim jedinjenjima u ispitivanoj vrsti, rezultati su upoređivani sa rezultatima dobijenim kod nekih drugih vrsta roda *Anthriscus*, kao i kod drugih biljaka koje pripadaju porodici Apiaceae (**Tabela 15**).

Koristeći tečnu hromatografiju u kombinaciji sa masenom spektrometrijom, identifikovano je ukupno 32 jedinjenja. Koliko je poznato, ovo je prvi izveštaj o identifikaciji 32 fenolna jedinjenja u ovoj biljci. U **Tabeli 15** su navedena sva identifikovana jedinjenja sa retencionim vremenima i glavnim karakteristikama masene spektrometrije (tačne mase i MS², MS³ i MS⁴ fragmentacije). Među 32 jedinjenja, njih 17 pripada fenolnim kiselinama i srodnim jedinjenjima, a 15 su aglikoni i glikozidi flavonoida. Prisustvo 10 jedinjenja (kofeinska kiselina – **3**, eskulin – **4**, hlorogena kiselina – **6**, *p*-kumarinska kiselina – **7**, ferulinska kiselina – **8**, rutin – **18**, cinarozid – **19**, apigetrin – **21**, luteolin – **24** i apigenin – **26**) potvrđeno je poređenjem sa dostupnim standardima.

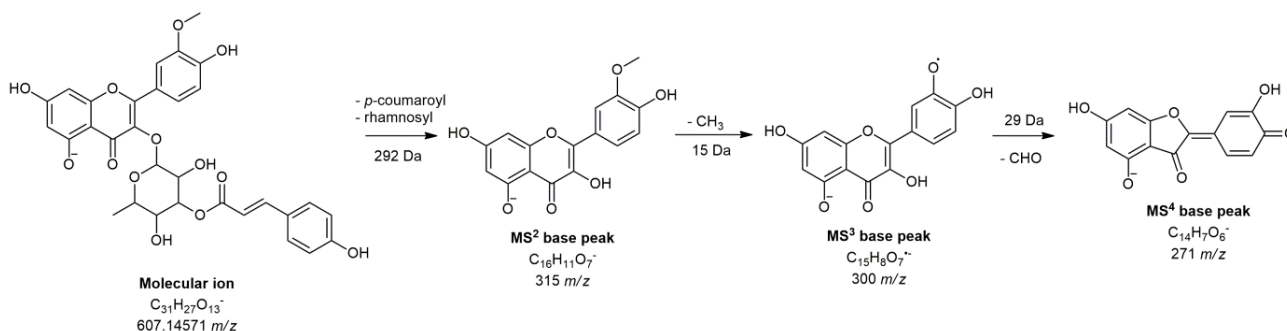
Što se tiče derivata fenolnih kiselina, pored prostih kiselina, pronađeni su i heksozidi i estri hininske kiseline. Sva jedinjenja, osim *o*-hidroksibenzojeve kiseline (jedinjenje **17**), pripadaju grupi hidroksicimetnih kiselina. Jedinjenje **17** detektovano na 8,17 min i 137 *m/z* pokazalo je karakterističan MS² osnovni pik na 93 *m/z* (generisan gubitkom CO₂ – 44 Da). Ovo jedinjenje je prethodno identifikovano kod *A. vulgaris* Bernh. (Apiaceae) iz Alžira [178]. Obrazac fragmentacije i MS spektri jedinjenja **1** (dihidroksibenzoil heksozid) u potpunosti su u skladu sa literaturom [138]. Ovo jedinjenje do sada nije otkriveno ni u jednom ekstraktu biljke iz porodice Apiaceae. Jedinjenja **11** i **16** (6,32 i 7,79 min, redom) su označena kao izomeri feruloilhinske kiseline. Za razliku od ostalih derivata, MS² osnovni pik 5-*O*-feruloilhinske kiseline pronađen je na 191 *m/z*, tako da ova jedinjenja mogu biti *cis* i *trans* izomeri. Slično tome, jedinjenja **13**, **14** i **15** (izomeri malonil-dikofeoilhinske kiseline) detektovana na 601 *m/z*, prethodno su identifikovana u ekstraktu *Erigeron breviscapus* (Apiaceae), i identifikovana su prema dostupnim literaturnim podacima [179].

Analizom flavonoida pronađena su jedinjenja iz podgrupe flavonola i flavona. Detektovana su samo dva aglikona, luteolin (jedinjenje **24**) i apigenin (jedinjenje **26**) i oba jedinjenja su već potvrđena u biljci *A. silvestris* Hoffm. (Apiaceae) [180]. Najviše identifikovanih flavonoida pripada flavonolnim glikozidima sa *p*-kumaroil ostatkom. Skoro sva takva jedinjenja su pokazala specifičnu fragmentaciju gde se masa deprotonovanog aglikona ne pojavljuje kao MS² osnovni pik, već se formira gubitkom mase aglikona. Tako je, na primer, jedinjenje **31** na 11,54 min i 723 *m/z* proizvelo MS² osnovni pik na 437 *m/z*, što odgovara fragmentu koji je rezultat gubitka kempferola [M–H–286][–], dok je MS² sekundarni pik pronađen na 285 *m/z* (deprotonovani kempferol). Dalje, MS³ fragmentacija je dala osnovni pik na 145 *m/z* (gubitak dva *p*-kumaroil ostatka) i sekundarne pikove na 291 i 163 *m/z* (**Slika 31**). Na osnovu svih ovih nalaza, pretpostavlja se da je dato jedinjenje kempferol 3-*O*-(2'',3''-di-*p*-kumaroil)-ramnozid, koji je prethodno izolovan iz cvetova *Foeniculum vulgare* Mill. i *Foeniculum dulce* DC. (Apiaceae) [181].



Slika 31. Šematski prikaz fragmentacije jedinjenja 31 (kempferol 3-*O*-(2'',3''-di-*p*-kumaroil)-ramnozid).

Još jedno jedinjenje koje, koliko je poznato, nije ranije otkriveno ni u jednom ekstraktu biljaka iz porodice Apiaceae, je jedinjenje **28** (izoramnetin 3-*O*-(3''-*p*-kumaroil)-ramnozid). Tačan položaj *p*-kumaroilnog ostatka može se samo pretpostaviti, ali jedino jedinjenje koje odgovara tačnoj masi i fragmentaciji našeg jedinjenja pronađeno je u ekstraktu *Persicaria glabra* (Villd.) M.Gomez [182]. Njegova predložena struktura i fragmentacija prikazani su na **Slici 32**.



Slika 32. Predloženi obrazac fragmentacije jedinjenja 28 (izoramnetin 3-*O*-(3''-*p*-kumaroil)-ramnozid)

Tabela 15. Masena spetrometrija visoke rezolucije (HRMS) i MS⁴ podaci za fenolne kiseline i flavonoide identifikovane u ekstraktu *Anthriscus cerefolium*.

Pik	Identifikovana jedinjenja	<i>t_R</i> , min	Mol. formula, [M-H] ⁻	Izračunata masa, [M-H] ⁻	Tačna masa, [M-H] ⁻	Δ ppm	MS ² Fragmenti, (% Osnovni Pik)	MS ³ Fragmenti, (% Osnovni Pik)	MS ⁴ Fragmenti, (% Osnovni Pik)
<i>Derivati fenolnih kiselina</i>									
1	Dihidroksibenzoil heksozid	3,95	C ₁₃ H ₁₅ O ₉ ⁻	315,07216	315,07246	-0,31	109(10), 152(22), 153 (100), 154(9), 268(10), 278(9), 279(23)	108(7), 109 (100)	NA
2	Kofeoil-heksozid, izomer 1	4,61	C ₁₅ H ₁₇ O ₉ ⁻	341,08781	341,08750	0,31	135(4), 179 (100), 180(3)	135 (100)	79(21), 107 (100), 117(49)
3	Kofeinska kiselina	4,61	C ₉ H ₇ O ₄ ⁻	179,03498	179,03487	0,11	89(19), 129(15), 134(11), 135 (100), 143(23), 144(20), 161(13)	91(9), 94(64), 106(6), 107 (100), 132(5)	NA
4	Eskulin	4,88	C ₁₅ H ₁₅ O ₉ ⁻	339,07216	339,07142	0,74	177 (100), 178(3)	89(4), 105(10), 133 (100), 149(6)	89 (100), 105(9), 123(15)
5	Kofeoil-heksozid, izomer 2	5,11	C ₁₅ H ₁₇ O ₉ ⁻	341,08781	341,08674	1,07	135(9), 179 (100), 180(7), 295(3)	135 (100)	79(18), 107 (100)
6	5-O-Kofeoilhinska kiselina, izomer 1 (hlorogena kiselina)	5,24	C ₁₆ H ₁₇ O ₉ ⁻	353,08781	353,08753	0,28	179(3), 191 (100)	85(95), 93(56), 111(41), 127 (100), 171(32), 173(81)	83(11), 85 (100), 97(10), 99(38), 109(29)
7	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	5,29	C ₉ H ₇ O ₃ ⁻	163,04007	163,03968	0,39	99(13), 115(18), 116(12), 119 (100), 128(16), 131(19), 135(12)	66 (100), 91(60)	NA
8	Ferulinska kiselina	5,57	C ₁₀ H ₉ O ₄ ⁻	193,05063	193,05139	-0,76	111(10), 134(6), 145(5), 147 (100), 148(15), 149(9), 150(7)	57(6), 85(13), 99(6), 101(7), 103(7), 119(7), 129 (100)	55(20), 57(50), 73(8), 85 (100), 101(14)
9	5-O-Kofeoilhinska kiselina, izomer 2	5,69	C ₁₆ H ₁₇ O ₉ ⁻	353,08781	353,08795	-0,15	179(3), 191 (100), 192(4)	85(98), 93(58), 109(22), 111(31), 127 (100), 173(69)	81(4), 83(11), 85 (100), 99(46), 109(27)
10	5-O- <i>p</i> -Kumaroilkvinska kiselina	5,87	C ₁₆ H ₁₇ O ₈ ⁻	337,09289	337,09270	0,19	163(4), 173(8), 191 (100)	85(96), 93(64), 109(26), 111(35), 127 (100), 173(91)	81(17), 83(12), 85 (100), 99(49), 109(59)
11	5-O-Feruloilhinska kiselina, izomer 1	6,32	C ₁₇ H ₁₉ O ₉ ⁻	367,10346	367,10372	-0,26	191 (100), 192(8), 193(4), 321(4)	85 (100), 93(54), 109(25), 111(35), 127(93), 173(81)	57 (100)
12	3,5-O-Dikofeoilhinska kiselina	7,04	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂ ⁻	515,11950	515,11763	1,87	191(13), 335(9), 353 (100), 354(14)	179(4), 191 (100)	85(93), 93(63), 111(32), 127 (100), 173(76)
13	Malonil-1,4-O-dikofeoilhinska kiselina	7,12	C ₂₈ H ₂₅ O ₁₅ ⁻	601,11989	601,12114	-1,25	395(55), 439(72), 440(12), 515(85), 516(20), 557 (100), 558(24)	233(32), 335(4), 377(9), 395 (100)	173(13), 233 (100), 335(8)

14	Malonil-1,5-O-dikofeoilhinska kiselina	7,34	C ₂₈ H ₂₅ O ₁₅ ⁻	601,11989	601,11856	1,33	233(10), 395 (100), 396(13), 439(9), 515(5), 557(58), 558(10)	173(12), 233 (100), 335(5)	155(3), 173 (100)
15	Malonil-4,5-O-dikofeoilhinska kiselina	7,47	C ₂₈ H ₂₅ O ₁₅ ⁻	601,11989	601,12119	-1,30	395(55), 396(11), 439(53), 515(56), 516(14), 557 (100), 558(23)	233(30), 335(4), 377(10), 395 (100), 515(3)	173(13), 233 (100), 335(7)
16	5-O-Feruloilhinska kiselina, izomer 2	7,79	C ₁₇ H ₁₉ O ₉ ⁻	367,10346	367,10270	0,75	191 (100), 192(16), 321(17), 322(9), 323(9), 329(8), 330(13)	85(99), 93(45), 109(29), 127 (100), 171(26), 173(56)	NA
17	<i>o</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	8,17	C ₇ H ₅ O ₃ ⁻	137,02442	137,02435	0,06	93 (100)	NA	

Derivati flavonoida

18	Kvercetin 3-O-(6"-ramnozoil)-glukozid (rutin)	6,40	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆ ⁻	609,14611	609,14539	0,72	225(5), 271(7), 300(37), 301 (100), 343(12)	151(77), 179 (100), 255(45), 257(13), 271(76), 273(19)	151 (100)
19	Luteolin 7-O-glukozid (Cinarozid)	6,68	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ ⁻	447,09329	447,08956	3,73	285 (100), 286(13)	151(41), 175 (100), 199(87), 217(80), 241(97), 243(70)	119(8), 131(86), 133(20), 147 (100), 157(5)
20	Kempferol 3-O-(6"-acetil)-heksozid	7,20	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₂ ⁻	489,10385	489,10298	0,87	285 (100), 286(9), 429(6)	151(37), 175(82), 199(88), 217(72), 241 (100), 243(59)	185(49), 197(99), 198 (100), 199(79), 213(61)
21	Apigenin 7-O-glukozid (Apigetrin)	7,22	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀ ⁻	431,09837	431,09842	-0,05	268(11), 269 (100), 270(11), 311(3)	149(30), 181(26), 183(27), 224(26), 225 (100), 227(29)	157(35), 169(44), 181(63), 196(40), 197 (100)
22	Kempferol 3-O-ramnozid	7,65	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀ ⁻	431,09837	431,09750	0,87	255(6), 284(60), 285 (100), 286(7), 327(4)	229(51), 241(29), 255(58), 256(51), 257 (100), 267(45)	163(75), 185(14), 213(23), 229 (100), 239(45)
23	Apigenin 7-O-(6"-acetil)-heksozid	8,43	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₁ ⁻	473,10894	473,10989	-0,95	268(50), 269 (100), 270(14), 311(6)	149(30), 151(21), 183(28), 197(34), 201(24), 225 (100)	169(37), 181(57), 183(39), 196(21), 197 (100)
24	Luteolin	8,65	C ₁₅ H ₉ O ₆ ⁻	285,04046	285,03874	1,73	151(28), 175(72), 197(21), 199(69), 217(55), 241 (100), 243(53)	197 (100), 198(80), 199(59), 212(21), 213(44), 223(29)	153(4), 169 (100), 179(10), 180(14), 182(5)
25	Kempferol 3-O-(6"- <i>p</i> -kumaroil)-heksozid	9,39	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃ ⁻	593,13007	593,12989	0,18	285 (100), 286(9), 307(31), 308(4)	151 (100), 213(50), 229(57), 241(42), 243(36), 257(87)	83(4), 107 (100)
26	Apigenin	9,50	C ₁₅ H ₉ O ₅ ⁻	269,04555	269,04531	0,23	149(45), 151(29), 183(17), 201(27), 225 (100), 226(18), 227(18)	169(13), 180(15), 181 (100), 183(27), 196(20), 197(38)	117(17), 139(25), 152 (100), 153(41), 163(7)
27	Kempferol 3-O-(4"- <i>p</i> -kumaroil)-ramnozid	9,90	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂ ⁻	577,13515	577,13701	-1,86	285 (100), 286(9)	151(80), 229(38), 241(41), 255(33), 257 (100), 267(27)	163(27), 211(7), 213(16), 229 (100), 239(12)
28	Izoramnetin 3-O-(3"- <i>p</i> -kumaroil)-ramnozid	10,10	C ₃₁ H ₂₇ O ₁₃ ⁻	607,14572	607,14261	3,11	284(6), 285(27), 299(16), 300(17), 315 (100), 316(11)	300 (100)	151(21), 227(12), 255(61), 271 (100), 272(51)
29	Kvercetin 3-O-(2"-6"- <i>di-p</i> -kumaroil)-heksozid	10,50	C ₃₉ H ₃₁ O ₁₆ ⁻	755,16176	755,16248	-0,72	271(3), 285(4), 301(3), 307(6), 469 (100), 470(20), 593(5)	135(11), 161(56), 179 (100), 271(22), 307(68)	NA

30	Kempferol 3-O-(2'',6''-di-<i>p</i>-kumaroil)-heksozid	11,08	C ₃₉ H ₃₁ O ₁₅ ⁻	739,16684	739,16671	0,14	285(9), 307(4), 453 (100), 454(22), 455(4), 593(4)	135(10), 161 (100), 163(31), 179(65), 289(12), 307(67)	117(3), 133 (100)
31	Kempferol 3-O-(2'',3''-di-<i>p</i>-kumaroil)-ramnozid	11,54	C ₃₉ H ₃₁ O ₁₄ ⁻	723,17193	723,16845	3,48	285(53), 286(8), 437 (100), 438(17), 439(3), 577(3)	145 (100), 163(71), 187(24), 211(14), 273(29), 291(46)	117 (100)
32	Kempferol 3-O-[2''-(4'''-metoksicinamoil)-6''-<i>p</i>-kumaroil]-heksozid	11,57	C ₄₀ H ₃₃ O ₁₅ ⁻	753,18249	753,18286	-0,36	285 (100), 286(9), 315(39), 437(49), 453(12), 467(77), 468(12)	151(87), 185(47), 213(46), 229(60), 239(42), 257 (100)	189(28), 213(57), 215(13), 229 (100), 239(24)

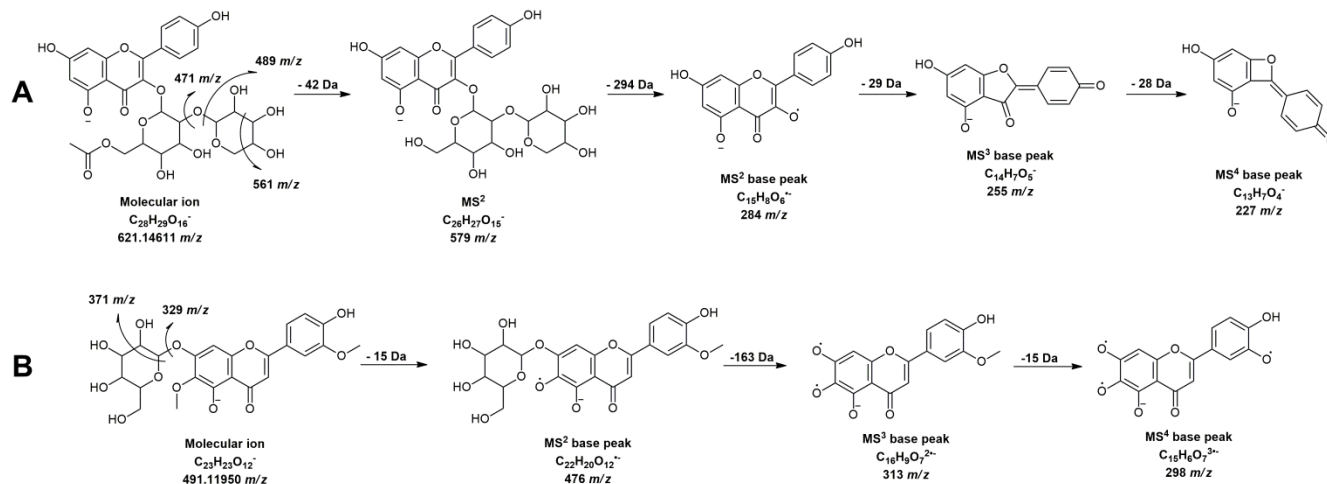
t_R – retenciono vreme; Δ ppm – tačnost srednje mase.

U metanolnom ekstraktu *O. spinosa* identifikovano je 63 polifenolnih jedinjenja. Sva detektovana jedinjenja mogu se podeliti u nekoliko grupa: fenolne kiseline, uključujući derivate hidroksibenzoeve i hidroksicimetne kiseline (23 jedinjenja), glikozide i aglikone flavonoida (26 jedinjenja), glikozide i aglikone izoflavonoida (9 jedinjenja), uključujući 3 jedinjenja iz grupe pterokarpana (kumesterol, 3-hidroksi-4,9-dimetoksikumestan i medikagol) i druga fenolna jedinjenja (5 jedinjenja), uključujući norneolignane puerol A i klitorienolakton B. **Tabela 16** sumira glavne MS podatke dobijene za svako od identifikovanih jedinjenja.

Fenolne kiseline su bile zastupljene kao slobodne fenolne kiseline, glikozidi sa pentozom i heksozom i estri sa vinskom i hininskom kiselinom. Zanimljivo je istaći da su u istraživanom ekstraktu identifikovani estri hidroksicimetne kiseline sa vinskom kiselinom, koji su specifični fenoli za familiju Lamiaceae [183]. Jedinjenja **8** i **22** na 4,98 i 6,84 min, redom, pokazuju isti molekularni jon na 311 m/z i identifikovana su kao izomeri kofeoilvinske (kaftarinske) kiseline. MS² osnovni pik ovih jedinjenja (149 m/z) nastao neutralnim gubitkom kofeoil grupe (162 Da) odgovara masi deprotonovane vinske kiseline. MS³ osnovni pik je detektovan na 87 m/z , koji je dobijen daljim gubitkom 62 Da (CO₂ i H₂O). Sličan obrazac fragmentacije primećen je i za druge derivate hidroksicimetne kiseline sa vinskom kiselinom (kumaroilvinska (kutarinska) kiselina) - **12**, izomeri feruloilvinske (fertarinske) kiseline - **14** i **18**, i izomeri dikofeoilvinske (cihorinska) kiseline - **20** i **23**). Jedinjenje **13** (5,37 min i 457 m/z) sa MS² osnovnim pikom na 163 m/z (gubitak jedne heksozil grupe - 162 Da i jedne pentozil grupe - 132 Da) je uslovno identifikovano kao pentozil-heksozid kumarinske kiseline. U ovom slučaju, MS² sekundarni pik je pronađen na 325 m/z (gubitak pentozilne grupe - 132 Da) i MS³ osnovni pik na 119 m/z (gubitak CO₂ - 44 Da), što je potvrdilo prisustvo kumarinske kiseline.

U ekstraktu *O. spinosa* identifikovano je 11 flavonoidnih aglikona, a prisustvo njih šest je potvrđeno upoređivanjem sa dostupnim standardima (kvercetin - **40**, luteolin - **41**, apigenin - **43**, kempferol - **44**, hrizoeriol - **45** i akacetin - **48**). Raniji literaturni podaci su otkrili da su metilovani derivati flavona veoma česti za vrste *Ononis* [117]. Naime, dihidroksitetrametoksiflavon (jedinjenje **47**), identifikovano na 11,68 min i 373 m/z i označeno kao himenoksin, prisutno je u nadzemnim delovima biljke *Ononis natrix* L. [184]. Ovo jedinjenje je proizvelo MS² osnovni pik na 358 m/z , koji je nastao eliminacijom metil grupe (15 Da) i MS³ osnovne pikove na 343 i 328 m/z , redom, dobijene daljim gubitkom metil grupa. Među petnaest flavonoidnih glikozida, tri (kvercetin 3-*O*-galaktozid - **28**, kempferol 3-*O*-glukozid - **32** i apigenin 7-*O*-glukozid - **34**) su identifikovani poređenjem njegovih MS podataka sa dostupnim standardima. Identifikovani flavonoidni diglikozidi (jedinjenja **25**, **26**, **27** i **29**) pokazali su fragmentaciju specifičnu za 1→2 interglikozidnu vezu između dva šećera [184]. Dakle, jedinjenje **29** na 6,79 min i 621 m/z je identifikovano kao kempferol 3-*O*-(2"-pentozil)acetil-heksozid. Ovo jedinjenje je dalo MS² osnovni pik na 285/284 m/z , što odgovara deprotonovanom kempferolu, a MS³ i MS⁴ podaci su potvrdili prisustvo kempferola kao aglikona. Dva MS² sekundarna pika na 561 m/z (neutralni gubitak od 60 Da) i 471 m/z (neutralni gubitak od 150 Da) bili su karakteristični za fragmentaciju glikozidnog ostatka u slučaju interglikozidne veze 1→2. MS² osnovni pik na 579 m/z formiran je neutralnim gubitkom acetilne grupe, najverovatnije sa 6 pozicije heksoze. Detaljan obrazac fragmentacije ovog jedinjenja je prikazan na **Slici 33A**. Jaceozidin 7-*O*-heksozid (jedinjenje **38**) na 7,44 min i

491 m/z , sa nespecifičnom fragmentacijom (gubitak metil grupe - 15 Da) u prvom koraku, pokazao je MS² osnovni pik na 476 m/z . MS³ osnovni pik na 314/313 m/z nastao je gubitkom heksozilne grupe (162 Da), a MS⁴ osnovni pik je formiran daljim gubitkom metil grupe (Slika 33B). Aglikon jaceozidin je već identifikovan u vrstama roda *Ononis* [117].



Slika 33. Predloženi put fragmentacije (A) kempferol 3-O-(2''-pentozil)acetil heksozida (jedinjenje 29) i (B) jaceozidin 7-O-heksozida (jedinjenje 38)

Prisustvo izoflavonoida i njihovih derivata iz grupa pterokarpana i norneolignana otkriveno je ranije kod vrsta roda *Ononis* [118,161,185]. U ovom istraživanju identifikovana su dva glikozida (derivati onogenina i formononetina) i sedam aglikona. Jedinjenje 50 na 5,40 min i 591 m/z dalo je MS² osnovni pik na 475 m/z , dobijen neutralnim gubitkom od 116 Da, što može biti ostatak jabučne kiseline. Ispitivanjem njegovog MS³ spektra primećen je osnovni pik na 312 m/z koji je dobijen gubitkom heksozilne grupe. Jedinjenje 52 (9,16 min i 517 m/z), dalo je MS² osnovni pik na 267 m/z (dobijen neutralnim gubitkom od 250 Da), i uslovno je identifikovano kao formononetin 7-O-gliceroil-heksozid. MS³ osnovni pik detektovan na 252 m/z odgovara gubitku metil grupe (15 Da), dok je MS⁴ osnovni pik nastao gubitkom 29 Da (CHO).

Što se tiče grupe ostalih fenolnih jedinjenja, detektovana su dva kumarina (eskuletin 6-O-glukozid - 59 i eskuletin - 60), dva derivata puerola (puerol A - 61 i klitorienolakton B - 62) i jedan halkon (izolikviritgenin - 63). Jedinjenje 61, identifikovano na 7,95 min i 297 m/z , dalo je MS² osnovni pik na 253 m/z dobijen gubitkom CO₂ (44 Da). MS³ osnovni pik na 147 m/z formiran je gubitkom od 106 Da, a MS⁴ osnovni pik na 119 m/z je nastao gubitkom od 28 Da.

Tabela 16. Masena spetrometrija visoke rezolucije (HRMS) i MS⁴ podaci za fenolna jedinjenja identifikovana u ekstraktu *Ononis spinosa*.

Pik	Identifikovana jedinjenja	t _R , min	Mol. formula, [M-H] ⁻	Izračunata masa, [M-H] ⁻	Tačna masa, [M-H] ⁻	Δ	MS ² Fragmenti, ppm (% Osnovni Pik)	MS ³ Fragmenti, (% Osnovni Pik)	MS ⁴ Fragmenti, (% Osnovni Pik)
<i>Derivati fenolnih kiselina</i>									
1	Heksozid galne kiseline	2,37	C ₇ H ₅ O ₅ ⁻	169,01425	169,01423	0,12	125(100)	107(100)	-
2	Dihidroksibenzoeva kiselina, izomer 1	2,88	C ₁₃ H ₁₅ O ₉ ⁻	315,07216	315,07178	1,21	153(100), 152(50), 109(15), 108(10)	109(100)	-
3	Dihidroksibenzoeva kiselina, izomer 2	3,64	C ₁₃ H ₁₅ O ₉ ⁻	315,07216	315,07160	1,78	153(100), 152(50), 109(15), 108(10)	109(100)	-
4	Protokatehinska kiselina	4,36	C ₇ H ₅ O ₄ ⁻	153,01933	153,01910	1,50	109(100), 95(75), 79(20), 59(10)	81(100), 68(25), 65(15)	-
5	Pentozid galne kiseline	4,38	C ₁₂ H ₁₃ O ₉ ⁻	301,05651	301,05646	0,17	283(50), 169(40), 150(10), 125(20)	168(100), 150(100), 124(15)	122(100), 106(5), 94(15), 82(10)
6	Heksozid kofeinske kiseline	4,61	C ₁₅ H ₁₇ O ₉ ⁻	341,08781	341,08743	1,11	191(10), 179(100), 135(10)	135(100)	-
7	Pentozid dihidroksibenzoeve kiseline	4,82	C ₁₂ H ₁₃ O ₈ ⁻	285,06159	285,06140	0,67	153(100), 152(25), 109(5), 108(5)	109(100)	81(100)
8	Kaftarinska kiselina, izomer 1	4,98	C ₁₃ H ₁₁ O ₉ ⁻	311,04031	311,04019	0,39	179(40), 177(15), 149(100)	131(50), 103(90), 87(100), 59(25)	-
9	Heksozid hidroksibenzoeve kiseline	5,02	C ₁₃ H ₁₅ O ₈ ⁻	299,07724	299,07669	1,84	137(100)	93(100)	-
10	5-O-Kofeoilhinska kiselina	5,23	C ₁₆ H ₁₇ O ₉ ⁻	353,08781	353,08749	0,91	191(100), 179(5)	173(75), 127(100), 111(40), 93(60), 85(90)	109(40), 99(50), 85(100)
11	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	5,27	C ₇ H ₅ O ₃ ⁻	137,02442	137,02411	2,26	109(10), 93(100)	-	-
12	Kutarinska kiselina	5,35	C ₁₃ H ₁₁ O ₈ ⁻	295,04594	295,04535	2,00	163(100), 149(10), 119(5)	119(100)	-
13	Pentozil-heksozid kumarinske kiseline	5,37	C ₂₀ H ₂₅ O ₁₂ ⁻	457,13515	457,13373	3,11	325(10), 205(10), 163(100)	119(100)	-
14	Fertarinska kiselina, izomer 1	5,66	C ₁₅ H ₁₇ O ₈ ⁻	325,05651	325,05630	0,65	193(100), 149(10)	178(60), 149(100), 134(80)	134(100)
15	<i>p</i> -Hidroksifenilsirćetna kiselina	5,75	C ₈ H ₇ O ₃ ⁻	151,04007	151,03999	0,53	121(15), 107(100), 79(15), 59(25)	95(70), 123(10), 95(30), 69(10), 51(20)	79(100), -
16	Kofeinska kiselina	5,78	C ₉ H ₇ O ₄ ⁻	179,03498	179,03436	3,46	135(100)	135(60), 117(15), 107(100), 91(55), 79(15)	-

17	Gentizinska kiselina	5,96	C ₇ H ₅ O ₄ ⁻	153,01933	153,01906	1,76	136(5), 125(10), 95(20), 79(10)	109(100), 81(85), 67(100), 63(60)	-
18	Fertarinska kiselina, izomer 2	6,25	C ₁₅ H ₁₇ O ₈ ⁻	325,05651	325,05563	2,71	193(100), 149(5)	178(60), 149(100), 134(80)	134(100)
19	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	6,67	C ₉ H ₇ O ₃ ⁻	163,04007	163,04004	0,18	119(100)	119(60), 101(20), 93(25), 91(100), 72(10)	-
20	Cihorinska kiselina, izomer 1	6,75	C ₂₂ H ₁₇ O ₁₂ ⁻	473,07255	473,07053	4,27	311(85), 179(10), 149(10)	293(100), 219(5), 275(20), 231(10), 139(10), 113(5)	219(100), 191(100), 173(10), 163(15)
21	Vanilinska kiselina	6,83	C ₈ H ₇ O ₄ ⁻	167,03498	167,03497	0,06	153(10), 123(100), 108(20)	152(80), 124(10), 108(100)	123(30), 80(35), 78(100)
22	Kaftarinska kiselina, izomer 2	6,84	C ₁₃ H ₁₁ O ₉ ⁻	311,04031	311,04016	0,48	179(40), 177(15), 149(100)	131(50), 103(90), 87(100), 59(25)	-
23	Cihorinska kiselina izomer 2	7,36	C ₂₂ H ₁₇ O ₁₂ ⁻	473,07255	473,07166	1,88	311(100), 179(10), 149(15)	293(70), 219(5), 179(45), 149(100), 135(5)	131(40), 103(100), 87(90)

Flavonoidi

24	Aromadendrin 7- <i>O</i> -heksozid	5,82	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁ ⁻	449,10894	449,10751	3,18	288(15), 259(40)	287(100), 269(40), 259(100), 243(15), 201(5)	241(30), 173(35), 125(60)	
25	Kvercetin 3- <i>O</i> -(2"-pentozil)heksozid	6,16	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₆ ⁻	595,13046	595,12897	2,50	475(5), 343(5), 271(10), 255(5)	463(10), 301(20), 255(5)	445(15), 300(100), 271(100), 255(50), 243(5)	243(100), 215(20), 199(15)
26	Kempferol 3- <i>O</i> -(2"-heksozil)heksozid	6,23	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆ ⁻	609,14611	609,14514	1,59	489(5), 371(20), 255(20)	447(10), 285(100), 284(70), 213(30), 151(70)	429(80), 257(100), 241(50), 229(40), 255(10), 239(30), 229(100), 163(40)	
27	Kempferol 3- <i>O</i> -(2"-pentozil)heksozid	6,54	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₅ ⁻	579,13554	579,13281	4,71	459(5), 327(10), 255(25)	447(15), 285(90), 284(100), 255(100), 227(10)	429(40), 255(5), 237(10), 227(50), 213(15), 211(100)	
28	Kvercetin 3- <i>O</i> -galaktozid	6,61	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ ⁻	463,08820	463,08685	2,92	301(100), 300(30)	273(25), 257(20), 179(100), 151(75)	151(100)	
29	Kempferol 3- <i>O</i> -(2"-pentozil)acetil-heksozid	6,79	C ₂₈ H ₂₉ O ₁₆ ⁻	621,14611	621,14610	0,02	579(20), 471(40), 284(100), 255(30)	561(15), 327(10), 285(50), 255(100), 227(10)	489(25), 255(15), 213(30), 211(80), 199(15)	
30	Nepetin 7- <i>O</i> -heksozid	6,85	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂ ⁻	477,10385	477,10269	2,43	462(5), 315(100), 300(15)	357(25), 316(20), 300(100)	283(50), 255(85), 216(100)	
31	Kvercetin 3- <i>O</i> -pentozid	6,97	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₁ ⁻	433,07763	433,07654	2,52	343(5), 301(80), 300(100)	271(100), 151(10)	255(60), 179(10), 243(100), 215(20), 199(20)	

32	Kempferol 3-O-glukozid	7,04	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ ⁻	447,09329	447,09109	4,92	327(20), 255(10)	285(80),	284 (100),	255 (100), 227(10)	227 (100), 211(60)
33	Kvercetin 3-O-acetil-heksozid	7,20	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₃ ⁻	505,09876	505,09717	3,15	463(20), 300(60), 299(50)	343(20),	301 (100), 273(20), 151(75)	257(20), 179 (100), 151 (100)	
34	Apigenin 7-O-glukozid	7,21	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀ ⁻	431,09837	431,09814	0,53	311(5), 269 (100)		269(30), 255 (100), 183(30), 151(20)	197(45), 210(10), 181(50), 169(40)	197 (100),
35	Kempferol 3-O-acetil-heksozid	7,25	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₂ ⁻	489,10385	489,10245	2,86	447(15), 327(10), 255(10)	429(5), 285(90),	339(5), 284 (100), 255 (100),	227(15)	255(5), 237(10), 227(50), 213(15), 211 (100)
36	Kempferol 3-O-pentozid	7,29	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₀ ⁻	417,08272	417,08197	1,80	327(10), 255(10)	285(30),	284 (100),	255 (100), 227(15)	255(15), 227 (100), 211(80), 167(15)
37	Hispidulin 7-O-heksozid	7,32	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₁ ⁻	461,10894	461,10760	2,91	446(40), 299 (100), 284(30)	341(5),	300(10), 284 (100)		255 (100), 239(30), 227(50), 212(25), 200(40)
38	Jaceozidin 7-O-heksozid	7,44	C ₂₃ H ₂₃ O ₁₂ ⁻	491,11950	491,11816	2,73	477(20), 329(80), 313(40)	476 (100),	371(5), 445(5), 343(20), 314(25), 313 (100), 285(5)	317(10), 299(5), 298 (100),	295(10), 285(80), 282(20), 270(10)
39	Hispidulin	8,59	C ₁₆ H ₁₁ O ₆ ⁻	299,05611	299,05563	1,61	285(15), 255(30)	284 (100),	263(40), 256 (100), 161(15)	240(15), 227(2), 228 (100),	212(60), 184(40)
40	Kvercetin	8,60	C ₁₅ H ₉ O ₇ ⁻	301,03537	301,03532	0,17	283(15), 179 (100), 151(80)	271(60),	257(25), 151 (100)		107 (100), 83(10)
41	Luteolin	8,66	C ₁₅ H ₉ O ₆ ⁻	285,04046	285,03943	3,61	257(40), 199(70), 175(70)	241 (100),	217(50), 255(50), 227 (100), 197(35), 183(85)	211(75),	-
42	Nepetin	8,79	C ₁₆ H ₁₁ O ₇ ⁻	315,05103	315,05005	3,11	301(20), 300 (100)		283(40), 272(50), 228(80), 216 (100)	255(60), 201(30), 173(10), 159(10), 143(5)	188 (100),
43	Apigenin	9,52	C ₁₅ H ₉ O ₅ ⁻	269,04554	269,04517	1,38	225 (100), 151(25), 149(40)	201(30),	153(20), 197(30), 181 (100), 157(10)	169(15), 153 (100),	152(35), 241(20), 137(10)
44	Kempferol	9,67	C ₁₅ H ₉ O ₆ ⁻	285,04046	285,03955	3,19	255 (100), 227(10)		211 (100), 195(5), 167(15)	211(40), 137 (100)	
45	Hrizoeriol	9,70	C ₁₆ H ₁₁ O ₆ ⁻	299,05611	299,05472	4,65	285(10), 284 (100)		284(20), 256 (100), 228(30), 227(30)	239(10), 256(10), 239(5), 228(80), 227 (100), 200(65)	
46	Velutin	10,90	C ₁₇ H ₁₃ O ₆ ⁻	313,07176	313,07150	0,83	298 (100)		283 (100), 269(60)	255 (100), 227(10), 163(10)	239(5),
47	Himenoksin	11,68	C ₁₉ H ₁₇ O ₈ ⁻	373,09289	373,09177	3,00	358 (100)		343 (100)	328 (100), 312(50)	
48	Akacetin	11,97	C ₁₆ H ₁₁ O ₅ ⁻	283,06119	283,06088	1,10	268 (100)		268 (100), 240(30)	239(15), 211 (100),	223(20), 196(75), 172(60)

49	Apigenin 7,4'-dimetil etar	12,02	C ₁₇ H ₁₃ O ₅ ⁻	297,07685	297,07635	1,68	283(15), 254(10)	282(100),	269(5),	267(100), 239(90)	239(100)	
Izoflavonoidi												
50	Onogenin 7-O-malil-heksozid	5,40	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₅ ⁻	591,13554	591,13531	0,39	476(20), 445(15), 296(15)	475(100), 441(5),	459(15), 297(5),	313(70), 312(100), 241(5), 163(15)	285(10), 284(70), 256(100), 175(35)	267(80), 240(40)
51	Daidzein	8,40	C ₁₅ H ₉ O ₄ ⁻	253,05063	253,05017	1,82	253(100), 197(20)	225(40),	209(40),	253(20), 224(80), 196(30), 180(40)	209(100),	-
52	Formononetin 7-O-gliceroil-heksozid	9,16	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₂ ⁻	517,13515	517,13312	3,93	267(100)			252(100)	224(50), 208(70), 195(20), 132(25)	223(100),
53	Kalikozin D	9,54	C ₁₆ H ₁₁ O ₅ ⁻	283,06119	283,06076	1,52	267(10), 255(100), 240(30)			240(100)	223(5), 211(25), 196(90), 172(10)	212(100),
54	Pseudobaptigenin	10,39	C ₁₆ H ₉ O ₅ ⁻	281,04555	281,04431	4,41	253(100)			225(95), 224(45), 211(25), 209(100), 197(20), 185(30)	191(25), 180(50), 167(50), 153(25)	181(100),
55	Formononetin	10,59	C ₁₆ H ₁₁ O ₄ ⁻	267,06628	267,06628	0,00	253(10), 252(100)			224(50), 223(100), 195(20), 132(20)	208(70),	195(100)
56	Kumesterol	10,88	C ₁₅ H ₁₁ O ₅ ⁻	271,06120	271,06076	1,62	256(10), 212(20), 199(30), 135(30)	243(100),	227(30),	228(20), 199(100), 184(40)		184(100)
57	Monohidroksi-dimetoksikumestan	11,17	C ₁₇ H ₁₁ O ₆ ⁻	311,05611	311,05563	1,54	296(100)			281(100)		252(100)
58	Medikagol	11,90	C ₁₆ H ₇ O ₆ ⁻	295,02481	295,02411	2,37	268(10), 211(5)	267(100),	236(10),	239(100), 223(10), 211(20)		211(100)
Druga jedinjenja												
59	Eskuletin 6-O-glukozid	4,88	C ₁₅ H ₁₅ O ₉ ⁻	339,07216	339,07193	0,68	177(100)			177(5), 149(10), 105(10), 89(5)	133(100),	89(100)
60	Eskuletin	5,76	C ₉ H ₅ O ₄ ⁻	177,01933	177,01909	1,36	147(20), 131(30), 105(10)	135(40),	133(100),	105(100), 98(90), 77(10)		-
61	Puerol A	7,95	C ₁₇ H ₁₃ O ₅ ⁻	297,07685	297,07571	3,84	253(100)			238(40), 211(60), 159(70), 147(100), 109(45)	209(90),	119(100), 105(5)
62	Klitorienolakton B	9,04	C ₁₈ H ₁₅ O ₅ ⁻	311,09250	311,09155	3,05	205(100), 190(10)			190(100), 161(10)		162(15), 161(100), 146(5)
63	Isolikuiritigenin	10,23	C ₁₅ H ₁₁ O ₄ ⁻	255,06628	255,06613	0,59	135(100), 119(10)			91(100)		-

t_R - retenciono vreme; Δ ppm - tačnost srednje mase.

U ekstraktu *P. fruticosa* su identifikovana 44 jedinjenja koja pripadaju fenolnim kiselinama, fenilpropanoidima, flavonoidima i jedinjenjima srodnom fenolima. Fenolne kiseline su predstavljene sa 13 jedinjenja; fenilpropanoidni glikozidi sa 9 jedinjenja; otkriveno je 20 flavonoidnih glikozida i aglikona i 2 jedinjenja srodna fenolima. Identifikovana jedinjenja su predstavljena u **Tabeli 17** zajedno sa glavnim MS podacima.

U uzorku su detektovane slobodne fenolne kiseline, kao i pentozni i heksozni glikozidi fenolnih kiselina i njihovi estri sa hininskom kiselinom. Za pozitivnu identifikaciju jedinjenja **1, 5, 6, 9 i 11** korišćene su hromatografske karakteristike koje odgovaraju standardima sledećih kiselina: galna, 5-*O*-kofeoilhinska kiselina, *p*-hidroksibenzoeva, dihidroksibenzoeva (protokatehinska) i kofeinska kiselina. Jedinjenja **1** [186], **6** [187], **7** [188], **9** [150], **11** [189] su ranije zabeležena u vrstama roda *Phlomis*, dok jedinjenja **2, 3, 8, 12 i 13** nisu ranije detektovana u *Phlomis* vrstama. Jedinjenje **2** na 4,20 min sa molekularnim jonom na 461 *m/z* označeno je kao pentozil-heksozid hidroksi-metoksibenzoeve kiseline. Pokazalo je MS² osnovni pik na 167 *m/z* formiran gubitkom od 294 Da (heksozil (162 Da) + pentozil (132 Da)). MS³ spektar je pokazao osnovni pik na 152 *m/z* (gubitak metil grupe - 15 Da), dok je MS⁴ osnovni pik nastao daljim gubitkom CO₂ (44 Da). Jedinjenja **3** (4,57 min), **5** (5,20 min), **7** (5,32 min) i **10** (5,68 min) identifikovana su kao derivati kofeoilhinske kiseline i njihova fragmentacija je potvrđena u literaturi [190]. Utvrđeno je da su jedinjenja **8** (5,37 min) i **13** (6,11 min) izomeri heksozida kofeinske kiseline sa istim masama (341 *m/z*) i vrlo sličnim obrascem fragmentacije. MS² osnovni pik u oba slučaja je pronađen na 179 *m/z*, što može odgovarati ostatku kofeinske kiseline ili ostatku heksoze. MS³ osnovni pik na 143 *m/z* potvrđuje da je u MS² spektru postojao ostatak heksoze, s obzirom da se javljaju gubici od 36 Da, što odgovara masi dva molekula vode. Ostala jedinjenja iz grupe fenolnih kiselina (**4, 5 i 10**) identifikovana su na osnovu njihovih karakterističnih MS spektara, obrasca fragmentacije i informacija koje su prethodno objavljene u literaturi [189].

Što se tiče fenilpropanoidnih glikozida, u ispitivanom uzorku je identifikovano 9 jedinjenja. Fenilpropanoidni glikozidi **17, 19 i 20** su prethodno izolovani iz *P. fruticosa* [191]. Koliko je poznato, jedinjenja **14, 16, 18, 21-23** nisu ranije detektovana u *P. fruticosa*. Jedinjenje **15** je ranije identifikovano u *Phlomis umbrosa* [192], dok je jedinjenje **16** opisano u *P. sieheana*. Jedinjenja **17-23** su ranije prijavljena kod *P. nissolii* i drugih vrsta *Phlomis* [193]. Molekularni joni izomernih jedinjenja **18 i 20** (6,53 i 5,79 min, redom) detektovani su na 623 *m/z* i njihov obrazac fragmentacije je bio veoma sličan. Tentativna identifikacija ova dva jedinjenja, označena kao verbaskozid (**18**) i izoverbaskozid (**20**), je određena na osnovu njihovih hromatografskih karakteristika [194].

Ukupno 20 flavonoida specifičnih za rod *Phlomis* je identifikovano u ekstraktu *P. fruticosa* (**Tabela 17**). Dva jedinjenja, srodna fenolima, vanilil heksozid (**43**) i lunarozid (**44**), su identifikovana u ekstraktu.

Tabela 17. Masena spetrometrija visoke rezolucije (HRMS) i MS⁴ podaci za fenolna jedinjenja identifikovana u ekstraktu *P. fruticosa*.

Pi k	Identifikovana jedinjenja	<i>t_R</i> , min	Mol. formula, [M-H] ⁻	Izračunata masa, [M-H] ⁻	Tačna masa, [M-H] ⁻	Δ ppm	MS ² Fragmenti, (% Osnovni Pik)	MS ³ Fragmenti, (% Osnovni Pik)	MS ⁴ Fragmenti, (% Osnovni Pik)
<i>Derivati fenolnih kiselina</i>									
1	Galna kiselina	2,38	C ₇ H ₅ O ₅ ⁻	169,01425	169,01419	0,34	98(4), 122(3), 123(8), 124(7), 125(100), 126(10), 130(4)	69(7), 71(21), 81(59), 97(100), 107(11), 108(20)	ND
2	Pentozil-heksozid hidroksi-metoksibenzoeve kiseline	4,20	C ₁₉ H ₂₅ O ₁₃ ⁻	461,13007	461,12994	0,28	152(17), 167(100), 168(6), 329(13), 417(6), 423(7), 425(10)	108(10), 123(78), 152(100)	108(100)
3	3-O-Kofeoilhinska kiselina	4,57	C ₁₆ H ₁₇ O ₉ ⁻	353,08781	353,08719	1,73	135(5), 179(30), 191(100), 192(4)	85(100), 93(54), 111(42), 127(86), 171(27), 173(75)	57(100)
4	Sverciamakrozid	4,75	C ₂₁ H ₂₇ O ₁₃ ⁻	487,14572	487,14441	2,68	179(100)	135(100)	107(100)
5	5-O-Kofeoilhinska kiselina, izomer 1	5,20	C ₁₆ H ₁₇ O ₉ ⁻	353,08781	353,08662	3,35	179(3), 191(100)	85(93), 93(53), 111(39), 127(100), 171(31), 173(73)	81(9), 83(8), 85(100), 99(27), 109(31)
6	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	5,27	C ₇ H ₅ O ₃ ⁻	137,02442	137,02422	1,45	92(19), 93(100), 94(22), 108(13), 109(36), 110(13), 123(38)	ND	ND
7	4-O-Kofeoilhinska kiselina	5,32	C ₁₆ H ₁₇ O ₉ ⁻	353,08781	353,08739	1,19	135(8), 173(100), 174(4), 179(62), 180(4), 191(62), 215(3)	59(7), 71(18), 93(100), 109(9), 111(55), 155(13)	ND
8	Heksozid kofeinske kiseline, izomer 1	5,37	C ₁₅ H ₁₇ O ₉ ⁻	341,08781	341,08734	1,38	179(100), 180(4), 295(4), 323(4)	75(7), 81(8), 99(25), 135(15), 143(100), 161(38)	71(24), 81(100), 87(5), 99(36), 125(32)
9	Protokatehinska kiselina	5,44	C ₇ H ₅ O ₄ ⁻	153,01933	153,01914	1,28	107(3), 108(8), 109(100), 110(7)	65(17), 66(54), 80(20), 81(100)	ND
10	5-O-kofeoilhinske kiseline, izomer 2	5,68	C ₁₆ H ₁₇ O ₉ ⁻	353,08781	353,08722	1,67	191(100)	85(96), 93(61), 111(34), 127(100), 171(29), 173(69)	81(5), 83(14), 85(100), 99(18), 109(20)
11	Kofeinska kiselina	5,76	C ₉ H ₇ O ₄ ⁻	179,03498	179,03433	3,64	135(100), 136(4)	79(25), 91(47), 106(12), 107(100), 109(6), 117(23)	ND
12	5- <i>O-p</i> -kumaroilhinska kiselina	5,85	C ₁₆ H ₁₇ O ₈ ⁻	337,09289	337,09236	1,59	163(4), 173(4), 191(100)	85(88), 93(55), 111(37), 127(100), 171(24), 173(67)	81(6), 83(49), 85(100), 99(48), 109(33)
13	Heksozid kofeinske kiseline, izomer 2	6,11	C ₁₅ H ₁₇ O ₉ ⁻	341,08781	341,08740	1,20	179(100), 180(3)	99(27), 125(5), 135(10), 143(100), 161(29)	71(17), 81(100), 99(36), 125(31)

Fenilpropanoidi

14	Dekofeoil-verbaskozid	4,57	C ₂₀ H ₂₉ O ₁₂ ⁻	461,16645	461,16467	3,87	135(60), 143(4), 161(13), 225(5), 297(16), 315 (100), 316(14)	113(6), 119(4), 135 (100), 143(3)	106(52), 107 (100)
15	β-Hidroksiverbaskozid	5,83	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₆ ⁻	639,19306	639,19269	0,58	459(8), 477(3), 487(3), 529(12), 621 (100), 622(21)	179(10), 459 (100), 469(15)	151 (100), 161(45), 163(10), 205(9), 247(12)
16	Forzitozid B	6,16	C ₃₄ H ₄₃ O ₁₉ ⁻	755,24040	755,24030	0,13	593 (100), 594(15), 595(4)	275(3), 315(5), 429(21), 447 (100), 461(71)	135(27), 315 (100)
17	Samiozid	6,46	C ₃₄ H ₄₃ O ₁₉ ⁻	755,24040	755,23759	3,73	593 (100), 594(16)	275(3), 315(3), 429(22), 447 (100), 461(85)	135(38), 315 (100)
18	Verbaskozid	6,53	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₅ ⁻	623,19814	623,19580	3,76	461 (100), 462(20), 463(6)	134(3), 135(60), 143(3), 161(17), 297(18), 315 (100)	119(6), 134(4), 135 (100), 179(4)
19	Alisonozid	6,62	C ₃₅ H ₄₅ O ₁₉ ⁻	769,25605	769,25577	0,37	461(4), 575(9), 593 (100), 594(14)	275(3), 315(4), 429(21), 447 (100), 461(80)	135(26), 149(14), 191(7), 315 (100)
20	Izoverbaskozid	6,79	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₅ ⁻	623,19814	623,19611	3,26	461 (100), 462(14)	134(5), 135(50), 143(4), 161(11), 297(16), 315 (100)	135 (100)
21	Leukoskeptozid A	7,12	C ₃₀ H ₃₇ O ₁₅ ⁻	637,21379	637,21307	1,12	443(3), 461 (100), 462(14), 475(10), 491(8)	135(56), 143(5), 161(10), 297(16), 315 (100)	101(6), 119(8), 135 (100)
22	Martinozid	7,83	C ₃₁ H ₃₉ O ₁₅ ⁻	651,22944	651,22941	0,04	193(19), 265(10), 457(28), 475 (100), 476(13), 487(6), 505(30)	143(19), 161(55), 311(55), 329 (100)	ND

Flavonoidi

23	Apigenin 6,8-di-C-heksozid	5,53	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅ ⁻	593,15119	593,15009	1,86	353(45), 354(8), 383(23), 473 (100), 474(22), 503(30), 575(10)	353 (100), 383(16)	233(3), 282(3), 297(50), 323(3), 325 (100), 335(3)
24	Apigenin 6-C-heksozid-8-C-pentozid	5,90	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₄ ⁻	563,14063	563,13928	2,39	353(32), 383(22), 443 (100), 444(18), 473(58), 474(13), 545(11)	353 (100), 383(25)	233(3), 282(4), 297(51), 325 (100)
25	Luteolin 7-O-(6"-pentozil)-heksozid	6,41	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₅ ⁻	579,13554	579,13519	0,60	285 (100), 286(9)	151(39), 175(90), 199(91), 217(70), 241 (100), 243(62)	197 (100), 198(71), 199(72), 213(53), 226(33)
26	Luteolin 7-O-(6"-ramnozil)-heksozid	6,41	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅ ⁻	593,15119	593,15051	1,15	285 (100), 286(10)	175(86), 199(84), 217(69), 241 (100), 243(59), 257(27)	197(76), 198 (100), 199(84), 213(79), 226(20)
27	Luteolin 7-O-glukozid	6,64	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ ⁻	447,09329	447,09271	1,28	284(8), 285 (100), 286(10)	151(39), 175(92), 199(97), 217(76), 241 (100), 243(65)	185(20), 197 (100), 198(86), 199(71), 213(62)

28	Luteolin 7-O-heksuronid	6,69	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₂ ⁻	461,07255	461,07070	4,01	285(100), 286(9), 357(3)	151(36), 175(87), 199(89), 217(70), 241 (100), 243(66)	185(12), 197 (100), 198(92), 199(79), 213(67)
29	Apigenin 7-O-glukozid	7,20	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀ ⁻	431,09837	431,09713	2,88	268(9), 269 (100), 270(8)	149(24), 183(23), 197(35), 201(23), 225 (100), 227(22)	169(35), 181(56), 183(41), 196(39), 197 (100)
30	Hrizoeriol 7-O-heksozid	7,35	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₁ ⁻	461,10894	461,10865	0,61	283(19), 284(25), 298(26), 299 (100), 300(15), 446(71), 447(15)	284 (100)	227(18), 228(14), 255(41), 256 (100), 284(14)
31	Hrizoeriol 7-O-heksuronid	7,40	C ₂₂ H ₁₉ O ₁₂ ⁻	475,08820	475,08755	1,37	175(5), 285(4), 299 (100), 300(16)	284 (100)	256 (100), 284(6)
32	Tricin 7-O-heksuronid	7,50	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₃ ⁻	505,09877	505,09875	0,04	315(4), 329 (100), 330(21), 341(5), 343(4), 459(4), 467(4)	314 (100)	299 (100)
33	Luteolin 7-O-(<i>p</i> -kumaroil)-heksozid, izomer 1	8,25	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃ ⁻	593,13007	593,12921	1,44	285 (100), 286(13), 447(4)	175(64), 199(59), 201(23), 217(61), 241 (100), 243(50)	197 (100), 198(64), 199(95), 213(66), 226(32)
34	Eriodiktiol	8,57	C ₁₅ H ₁₁ O ₆ ⁻	287,05611	287,05479	4,60	125(3), 135(3), 151 (100), 241(8), 269(3)	65(4), 83(4), 107 (100)	65 (100)
35	Isoramnetin	8,76	C ₁₆ H ₁₁ O ₇ ⁻	315,05103	315,05072	0,97	300 (100), 301(9)	216 (100), 227(65), 228(77), 255(58), 256(46), 272(56)	173(26), 174(5), 187(6), 188 (100), 201(26)
36	Hrizoeriol 7-O-(<i>p</i> -kumaroil)-heksozid, izomer 1	8,81	C ₃₁ H ₂₇ O ₁₃ ⁻	607,14572	607,14471	1,65	284(31), 285(21), 299 (100), 300(13), 307(4)	284 (100)	256 (100)
37	Luteolin 7-O-(<i>p</i> -kumaroil)-heksozid, izomer 2	8,88	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃ ⁻	593,13007	593,12946	1,02	285 (100), 286(10), 429(16), 430(3), 447(6)	175(82), 199(68), 201(25), 217(69), 241 (100), 243(50)	197 (100), 198(100), 199(64), 213(58), 226(26)
38	Hrizoeriol 7-O-(<i>p</i> -kumaroil)-heksozid, izomer 2	9,21	C ₃₁ H ₂₇ O ₁₃ ⁻	607,14572	607,14546	0,42	284(17), 285(9), 299 (100), 300(7)	284 (100)	256 (100)
39	Apigenin 7-O-(<i>p</i> -kumaroil)-heksozid	9,38	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂ ⁻	577,13515	577,13428	1,51	269 (100), 270(8), 413(12), 431(10)	149(38), 151(23), 183(21), 201(30), 224(18), 225 (100)	169(24), 181 (100), 183(48), 196(37), 197(59)
40	Naringenin	9,48	C ₁₅ H ₁₁ O ₅ ⁻	271,06120	271,06055	2,40	107(5), 149(7), 151 (100), 152(7), 177(21), 225(15), 253(5)	65(3), 83(6), 107 (100)	65 (100)
41	Apigenin	9,50	C ₁₅ H ₉ O ₅ ⁻	269,04555	269,04527	1,02	149(45), 151(30), 183(15), 201(31), 225 (100), 226(17), 227(19)	169(22), 180(14), 181 (100), 183(44), 196(27), 197(34)	81(17), 85(11), 141 (100), 152(62)

42	Hrizoeriol 7-O-(<i>p</i> -kumaroil)-heksozid, izomer 3	9,55	C ₃₁ H ₂₇ O ₁₃ ⁻	607,14572	607,14520	0,86	284(32), 285(51), 299 (100), 300(14), 429(43), 443(51), 461(32)	284 (100)	256 (100)
<i>Druga jedinjenja</i>									
43	Vanilil heksozid	4,23	C ₁₄ H ₁₉ O ₈ ⁻	315,10854	315,10806	1,53	135(11), 151(15), 153 (100), 154(9), 271(8), 278(12), 279(9)	109(28), 123 (100)	67(67), 79 (100), 93(72), 95(88), 105(97)
44	Lunarozid	6,99	C ₂₅ H ₄₃ O ₁₅ ⁻	583,26074	583,25934	2,40	289(8), 293(3), 421 (100), 422(14), 451(28), 452(5)	161(46), 233(21), 289 (100), 293(16)	101(22), 113(10), 159(9), 161 (100)

t_R – retenciono vreme; Δ ppm – tačnost srednje mase.

4.9 HPLC-DAD-ESI/MSⁿ analiza i kvantifikacija jedinjenja u ekstraktima *A. cerefolium*, *O. spinosa* i *P. fruticosa*

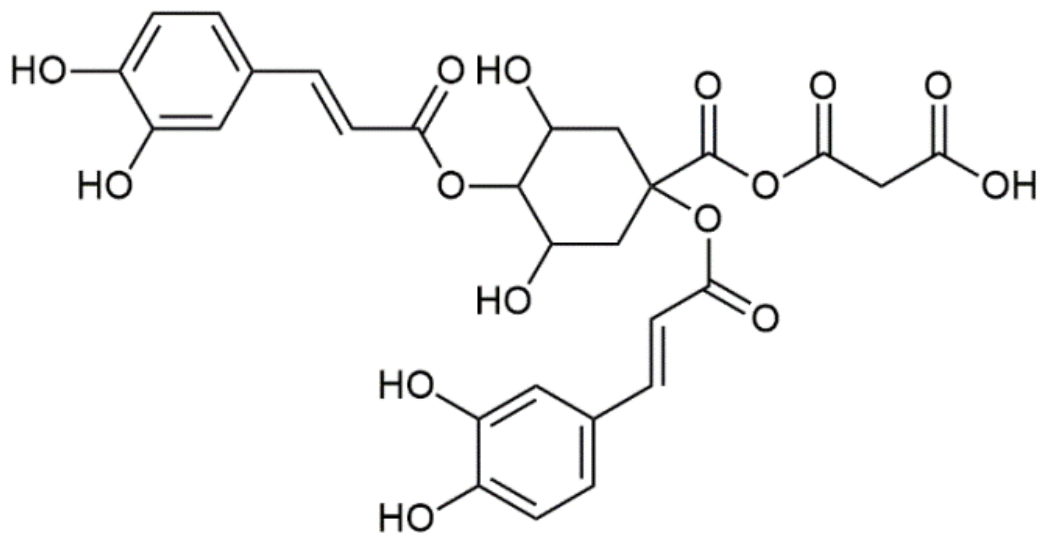
Hromatografski podaci dobijeni HPLC-DAD/ESI-MSⁿ, tentativna identifikacija i kvantifikacija (mg/g ekstrakata) fenolnih jedinjenja prisutnih u metanolnom ekstraktu *A. cerefolium*, prikazani su u **Tabeli 18**. Izvršena je tentativna identifikacija pikova upoređivanjem sa prethodnim hemijskim profilom ekstrakta. Dvanaest jedinjenja je identifikovano i kvantifikovano u uzorcima; deset fenolnih kiselina (derivati kofeinske i ferulinske kiseline) i dva flavonoida (kempferol i apigenin *O*-glikozilovani derivat). Derivati kofeinske kiseline su nesumnjivo bila jedinjenja sa najvećom koncentracijom.

Pikovi **1, 2, 4, 7, 8, 9, 10** i **11**, derivati kofeinske kiseline, predstavljeni su sa veoma karakterističnim UV spektrima, 323 do 329 nm. Pikovi **1** i **2** (na *m/z* 341) su identifikovani kao heksozidi kofeinske kiseline, uzimajući u obzir prethodnu analizu. Pik **4** (na *m/z* 353) određen je kao 5-*O*-kofeoilhinska kiselina (hlorogena kiselina) upoređivanjem njenog UV spektra i retencionog vremena sa dostupnim standardnim jedinjenjem. Pikovi **7** i **8** (na *m/z* 515) su identifikovani kao 3,5-*O*-dikofeoilhinska kiselina. Pošto su oba pika predstavljena veoma sličnim obrascem MS² fragmentacije, određeni su kao *cis* i *trans* izomeri 3,5-*O*-dikofeoilhinske kiseline (pik **7** i **8**, redom). Pikovi **9, 10** i **11** su uslovno identifikovani kao malonil-1,4-*O*-dikofeoilhinska kiselina (pik **9**), malonil-1,5-*O*-dikofeoilhinska kiselina (pik **10**) i malonil-4,5-*O*-dikofeoilhinska kiselina (pik **11**).

U uzorcima *A. cerefolium* pronađena su dva derivata ferulinske kiseline. Pik **3**, je identifikovan kao heksozid ferulinske kiseline. Pik **5** (na *m/z* 367) pokazuje karakterističnu fragmentaciju koja ukazuje na vezu između ferulinske kiseline i hininske kiseline, i identifikovan je kao 5-*O*-feruloilhinska kiselina, u skladu sa prethodnim analizama.

U ispitivanim uzorcima su pronađena dva *O*-glikozilovana flavonoida. Pik **6** je uslovno identifikovan kao kempferol-*O*-heksozid (pronađen samo u tragovima). Pik **12** je uslovno identifikovan kao apigenin-malonil-heksozid.

Što se tiče kvantifikacije, grupa fenolnih kiselina je bila zastupljena sa 95,5% (6,4 ± 0,35 mg/g ekstrakta) od ukupne količine fenolnih jedinjenja (6,7 ± 0,4 mg/g ekstrakta), uglavnom zbog prisustva malonil-1,4-*O*-dikofeoilhinske kiseline (**Slika 34**) koja je bila dominantno jedinjenje u testiranom ekstraktu (2,18±0,16 mg/g ekstrakta).



Slika 34. Hemijska struktura malonil-1,4-*O*-dikofeoilhinske kiseline, najzastupljenijeg jedinjenja u ekstraktu *A. cerefolium*

Tabela 18. Retenciono vreme (Rt), talasne dužine maksimalne apsorpcije u vidljivom spektru (λ_{\max}), podaci masenog spektra i tentativna identifikacija fenolnih jedinjenja prisutnih u *Anthriscus cerefolium*.

Pik	Rt (min)	λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁺ (m/z)	MS ² (m/z)	Tentativna identifikacija	Kvantifikacija (mg/g ekstrakta)
1	4,9	323	341	179(100),161(21),143(15)	Heksozid kofeinske kiseline	0,07 ± 0,01
2	5,21	323	341	179(100),161(18),143(8)	Heksozid kofeinske kiseline	0,12 ± 0,01
3	6,51	320	355	193(100),175(20),161(5),135(5)	Heksozid ferulinske kiseline	0,15 ± 0,01
4	7,15	325	353	191(100),179(8),161(5),135(5)	5-O-Kofeoilhinska kiselina	0,48 ± 0,05
5	14,04	327	367	193(6), 191(100), 173(4), 134(9)	5-O-Feruloilhinska kiselina	0,2 ± 0,017
6	19,05	333	447	285(100)	Kempferol-O-heksozid	tr
7	20,53	328	515	353(15),191(100),179(12),173(5),161(5),135(5)	<i>cis</i> 3,5-O-Dikofeoilhinska kiselina	0,68 ± 0,06
8	20,86	328	515	353(17),191(100),179(11),173(5),161(5),135(5)	<i>trans</i> 3,5-O-Dikofeoilhinska kiselina	1,12 ± 0,01
9	21,34	329	601	557(100),515(49),439(35),395(61),377(12),179(5),173(5)	Malonil-1,4-O-dikofeoilhinska kiselina	2,18 ± 0,16
10	23,17	328	601	557(100),515(61),439(33),395(55),377(10),179(5),173(5)	Malonil-1,5-O-dikofeoilhinska kiselina	0,82 ± 0,01
11	24,76	328	601	557(100),515(59),439(44),395(61),377(8),179(5),173(5)	Malonil-4,5-O-dikofeoilhinska kiselina	0,58 ± 0,02
12	28,15	330	517	473(100),269(35)	Apigenin-O-malonilheksozid	0,3 ± 0,04
Ukupne fenolne kiseline						6,4 ± 0,35
Ukupni flavonoidi						0,3 ± 0,04
Ukupno fenolnih jedinjenja						6,7 ± 0,39

tr – količine u tragovima. Standardne kalibracione krive: apigenin-7-O-glukozid ($y = 10683x - 45794$, $R^2 = 0,996$, LOD = 0,10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; LOK = 0,53 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pik 12); kofeinska kiselina ($y = 388345x + 406369$, $R^2 = 0,999$, LOD = 0,78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i LOK = 1,97 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pikovi 1 i 2); hlorogena kiselina ($y = 168823x - 161172$, $R^2 = 0,9999$, LOD = 0,20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i LOK = 0,68 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pikovi 4, 7, 8, 9, 19 i 11); ferulinska kiselina ($y = 633126x - 185462$, $R^2 = 0,999$, LOD = 0,20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; LOK = 1,01 mg/mL , pikovi 3 i 5); i kvercetin-3-O-rutinozid ($y = 13343x + 76751$, $R^2 = 0,9998$, LOD = 0,21 $\mu\text{g}/\text{mL}$; LOK = 0,71 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pik 6).

Hromatografski podaci dobijeni HPLC-DAD-ESI/MSⁿ analizom fenolnih jedinjenja prisutnih u ekstraktima *O. spinosa* predstavljeni su u **Tabeli 19** i na **Slici 35**. Identifikovano je i kvantifikovano šesnaest jedinjenja, sedam flavonoida, pet fenolnih kiselina i četiri izoflavonoida. Pikovi **3**, **9** i **13** (kofeinska kiselina, kvercetin-3-*O*-glukozid i kempferol-3-*O*-glukozid, redom) su identifikovani u poređenju sa odgovarajućim komercijalnim standardima, uzimajući u obzir njihove hromatografske karakteristike. Flavonoidi su bili najzastupljenija grupa pronađenih jedinjenja, kako po količini ($12,2 \pm 0,1$ mg/g ekstrakta), tako i po broju jedinjenja koja su identifikovana. Pikovi **7** (na *m/z* 609), **10** (na *m/z* 579) i **12** (na *m/z* 447), pokazali su jedinstveni MS² fragment na *m/z* 285 (kempferol aglikon), što odgovara gubitku od dve heksozil jedinice; jedan heksozil i jedna pentozilna jedinica; i jedna heksozil jedinica, redom, pa su identifikovani kao kempferol-*O*-diheksozid, kempferol-*O*-heksozid-pentozid i kempferol-*O*-heksozid, redom. Takođe su pronađena dva glikozilovana derivata kvercetina, pikovi **6** i **11**, uslovno identifikovani kao kvercetin-*O*-heksozid-pentozid i acetilkvercetin-*O*-heksozid, redom. Pik **6** na *m/z* 595 sa jedinstvenim MS² fragmentom na *m/z* 301 (kvercetin aglikon); pik **11** na *m/z* 505 pokazuje dva uzastopna MS² fragmenta na *m/z* 463 (acetilni ostatak) i na *m/z* 301 (heksozilni ostatak).

Što se tiče grupe fenolnih kiselina, pikovi **1** (na *m/z* 341) i **2** (na *m/z* 355) su identifikovani kao heksozid kofeinske kiseline i heksozid ferulinske kiseline, redom, na osnovu njihovih karakteristika UV-Vis spektra, obrasca fragmentacije i prethodne profila ekstrakta. Pikovi **4** i **5** (na *m/z* 473) su identifikovani kao *cis* i *trans* izomeri cihorinske kiseline, na osnovu hromatografskih informacija. Kao što je ranije pomenuto, ne postoje studije, prema saznanjima autora, o sastavu fenolnih kiselina u *O. spinosa*. Ipak, ova vrsta jedinjenja je već prijavljena u nadzemnim delovima *O. angustissima* L. [76].

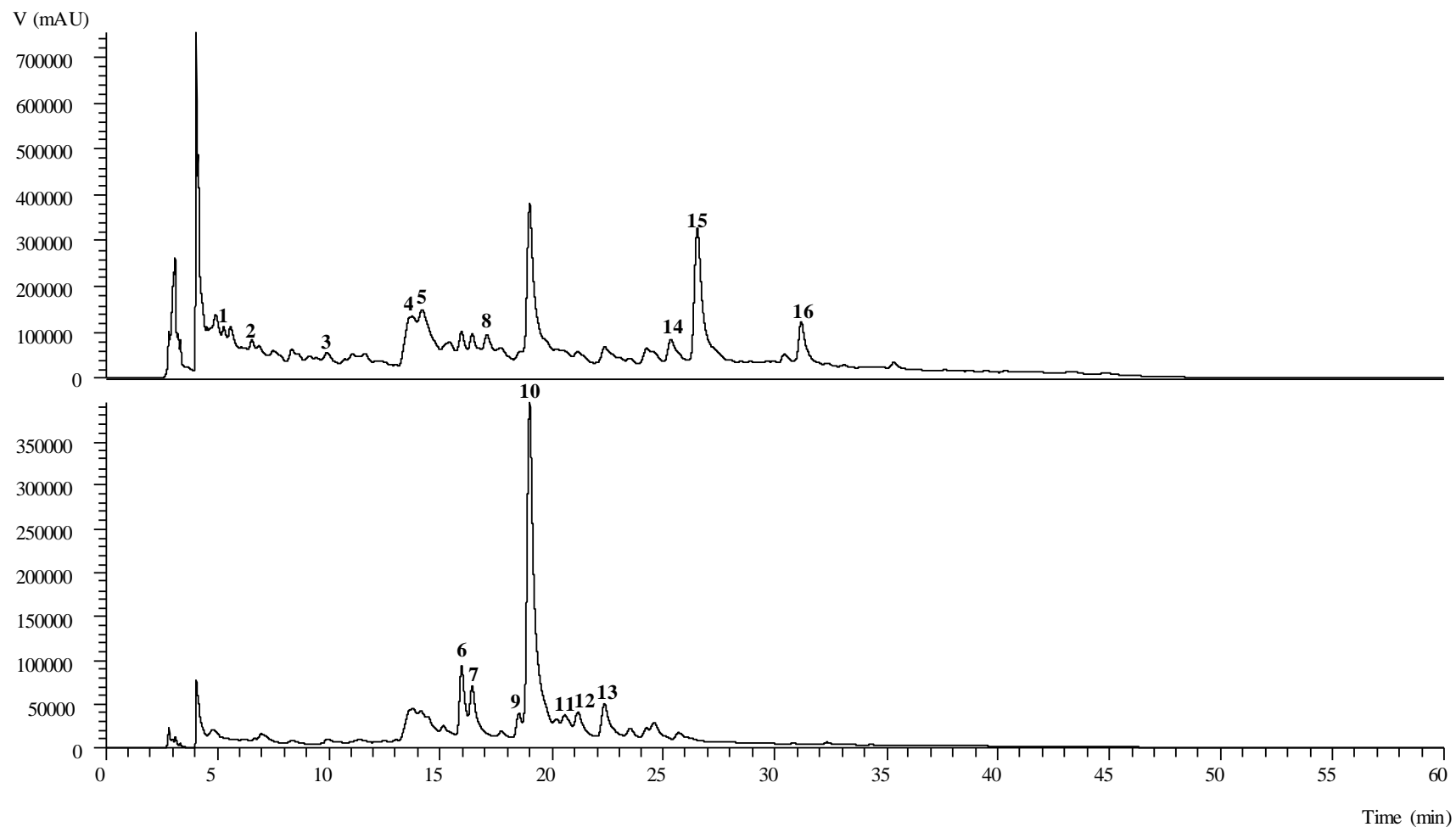
Grupa izoflavonoida pronađena u *O. spinosa* bila je u manjim količinama u poređenju sa druge dve grupe fenolnih jedinjenja. Ipak, ova grupa je opširno proučavana kod *O. spinosa* [120,195]. Pikovi **8** (na *m/z* 459), **14** (na *m/z* 489), **15** (na *m/z* 459) i **16** (na *m/z* 515), su identifikovani kao spinonin-*O*-heksozid, pseudobaptigenin-*O*-heksozid, formononetin 7-*O*-gliceroil-heksozid i formononetin-*O*-malonil-heksozid, redom, na osnovu njihovih hromatografskih karakteristika, kao i njihovog obrasca fragmentacije. Iako su dva od ovih jedinjenja pronađena u tragovima u proučavanom uzorku (pikovi 8 i 16), važno je istaći značaj izoflavonoida u ljudskom zdravlju, budući da su već intenzivno proučavani, uglavnom u mahunarkama, zbog njihovog dejstva na inhibiciju proliferacije određenih vrsta karcinoma ili protiv nekih neurodegenerativnih bolesti [119,196].

U ekstraktu *O. spinosa* najdominantnije jedinje je bilo kempferol 3-*O*-(2"-pentozil)heksozid ($5,1 \pm 0,2$ mg/g ekstrakta). Ubedljivo najdominantija grupa jedinjenja bili su flavonoidi ($9,1 \pm 0,1$ mg/g ekstrakta), zatim fenolne kiseline ($1,66 \pm 0,03$ mg/g ekstrakta) i fenilpropanoidi ($1,41 \pm 0,02$ mg/g ekstrakta).

Tabela 19. Retenciono vreme (Rt), talasne dužine maksimalne apsorpcije u vidljivom spektru (λ_{\max}), podaci masenog spektra i tentativna identifikacija fenolnih jedinjenja prisutnih u *Ononis spinosa* L.

Pik	Rt (min)	λ_{\max} (nm)	Molekularni jon [M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Tentativna identifikacija	Kvantifikacija (mg/g ekstrakta)
1	5.31	310	341	179(100),135(5)	Heksozid kofeinske kiseline	tr
2	6.55	287	355	193(100),179(5),149(5)	Heksozid ferulinske kiseline	0,078 ± 0,001
3	9.93	310	179	135(100)	Kofeinska kiselina	0,020 ± 0,001
4	13.66	328	473	311(100),293(92),267(5),179(5),149(8),135(5)	<i>cis</i> Cihorinska kiselina	0,81 ± 0,02
5	14.17	328	473	311(100),293(90),267(5),179(5),149(10),135(5)	<i>trans</i> Cihorinska kiselina	0,76 ± 0,01
6	15.96	348	595	301(100)	Kvercetin- <i>O</i> -heksozid-pentozid	0,824 ± 0,001
7	16.43	341	609	285(100)	Kempferol- <i>O</i> -diheksozid	0,732 ± 0,002
8	17.11	305	459	297(100)	Spinonin- <i>O</i> -heksozid	tr
9	18.5	328	463	301(100)	Kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	0,61 ± 0,01
10	19.07	346	579	285(100)	Kempferol 3-<i>O</i>-(2"-pentozil)heksozid	5,1 ± 0,2
11	20.58	348	505	463(70),301(100)	Acetilkvercetin- <i>O</i> -heksozid	0,566 ± 0,002
12	21.18	337	447	285(100)	Kempferol- <i>O</i> -heksozid	0,58 ± 0,01
13	22.37	340	447	285(100)	Kempferol-3- <i>O</i> -glukozid	0,71 ± 0,02
14	25.34	262/291	489	281(100)	Pseudobaptigenin- <i>O</i> -heksozid	0,134 ± 0,003
15	26.56	261/310	475	267(100)	Formononetin 7- <i>O</i> -glicerol-heksozid	1,28 ± 0,02
16	31.18	260/310	515	471(15),429(5),267(100)	Formononetin- <i>O</i> -malonil-heksozid	tr
Ukupne fenolne kiseline						1,66 ± 0,03
Ukupni izoflavonoidi						1,41 ± 0,02
Ukupni flavonoidi						9,1 ± 0,1
Ukupno fenolnih jedinjenja						12,2 ± 0,1

Tr-tragovi. Standardne kalibracione krive: A - kofeinska kiselina ($y = 388345x + 406369$, $R^2 = 0,9939$), B - ferulna kiselina ($y = 633126x - 185462$, $R^2 = 0,999$), C - kvercetin-3-*O*-rutinozid ($y = 13343x + 76751$, $R^2 = 0,9998$), D - kvercetin-3-*O*-glukozid ($y = 34843x - 160173$, $R^2 = 0,9998$), E - naringenin ($y = 18433x + 78903$, $R^2 = 0,9943$), F - hesperetin ($y = 34156x + 268027$, $R^2 = 0,9999$).



Slika 35. Retenciono vreme (Rt), talasne dužine maksimalne apsorpcije u vidljivom regionu (λ_{\max}), podaci masenog spektra i tentativna identifikacija fenolnih jedinjenja prisutnih u *Ononis spinosa* L.

U ekstraktu *P. fruticosa* je pronađeno i kvantifikovano dvanaest fenolnih jedinjenja uključujući četiri fenolne kiseline (derivati hlorogene kiseline), pet fenilpropanoidnih glikozida i tri flavonoida (C-glikozilovani apigenin i O-glikozilovani derivati luteolina) (Tabela 20).

Što se tiče grupe fenolnih kiselina, pik 4 (na m/z 353) je određen kao 5-O-kofeoilhinska kiselina (hlorogena kiselina) upoređivanjem njegovih UV spektra i retencionog vremena sa dostupnim standardnim jedinjenjem. Za identifikaciju pikova 1 i 2, koji su predstavljeni istim pseudomolekularnim jonom na m/z 353 i imali sličan obrazac fragmentacije kao pik 4, korišćen je hijerarhijski ključ za identifikaciju derivata hlorogene kiseline koji su razvili Clifford i saradnici [197], a pikovi 1 i 2 su dodeljeni kao *cis* i *trans* izomeri 3-O-kofeoilhinske kiseline. Pik 5 (na m/z 337) pokazao je sličan obrazac fragmentacije kao pikovi 1, 2 i 4, ali je ostvarena veza hinske grupe preko *p*-kumaroil grupe kiseline, pa je jedinjenje identifikovano kao 5-O-*p*-kumaroilhinska kiselina.

Grupa fenilpropanoidnih glikozida su bila brojčano najzastupljenija jedinjenja, obuhvatajući pikove 7 (na m/z 755), 8 (na m/z 623) i 10 (na m/z 769) koji su identifikovani kao forzitoid B, verbaskozid i alisonozid, redom. Pik 9 je pokazao isto hromatografsko ponašanje kao pik 8 (verbaskozid), sa pseudomolekularnim jonom na m/z 623 i istim MS² fragmentima na m/z 461 i 315. Na osnovu prethodne analize, pik 9 je uslovno identifikovan kao izoverbaskozid. Pik 11, koji takođe pokazuje isti hromatografski odgovor kao pikovi 9 i 8, identifikovan je kao izomer verbaskozida.

U grupi flavonoida su pronađena dva C-glikozilovana derivata apigenina, pikovi 3 (na m/z 593) i 6 (na m/z 563). Pik 3 je određen kao apigenin-6,8-C-diheksozid. Pik 6, je određen kao apigenin-C-heksozid-O-pentozid, jer je predstavljao tipičan obrazac fragmentacije derivata C-glikozida; međutim, tip šećera i veza su drugačije u odnosu na pik 3. Luteolin je takođe pronađen u uzorku (pik 12, na m/z 461) u obliku derivata koji je identifikovan kao luteolin-O-glukuronid, jer je pokazivao jedinstveni MS² fragment na m/z 285 (luteolin aglikon), što odgovara gubitku glukuronilne grupe.

Što se tiče kvantifikacije jedinjenja, najdominantnije jedinjenje u ekstraktu *P. fruticosa* je bilo *cis* 3-O-kofeoilhinska kiselina sa zastupljenošću od 4,2 mg/g ekstrakta. U ovom ekstraktu fenolne kiseline ($6,06 \pm 0,04$ mg/g ekstrakta) su bile grupa fenolnih jedinjenja sa najvećom koncentracijom, zatim fenilpropanoidi ($1,33 \pm 0,02$ mg/g ekstrakta), a u najmanjoj koncentraciji su nađeni flavonoidi ($0,75 \pm 0,01$ mg/g ekstrakta).

Tabela 20. Retenciono vreme (Rt), talasne dužine maksimalne apsorpcije u vidljivom spektru (λ_{\max}), podaci masenog spektra i tentativna identifikacija fenolnih jedinjenja prisutnih u *P. fruticosa*.

Peak	Rt (min)	λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Tentativna identifikacija	Kvantifikacija (mg/g ekstrakta)
1	7.15	325	353	191(100),179(8),161(5),135(5)	<i>cis</i> 3-O-Kofeoilhinska kiselina	4,2 ± 0,1
2	8.37	325	353	191(100),179(7),161(5),135(5)	<i>trans</i> 3-O-Kofeoilhinska kiselina	0,71 ± 0,03
3	9.99	332	593	473(100),383(17),353(25)	Apigenin-6,8-C-diheksozid	0,32 ± 0,01
4	10.74	325	353	191(100),179(20),173(5),161(5),135(5)	5-O-Kofeoilhinska kiselina	0,76 ± 0,01
5	11.73	320	337	191(100),173(5),163(15),155(5),119(5)	5-O- <i>p</i> -Kumaroilhinska kiselina	0,344 ± 0,002
6	13.95	332	563	443(100),431(10),311(5),269(5)	Apigenin-C-heksozid-C-pentozid	0,156 ± 0,003
7	15.16	330	755	593(12),461(87),447(100),315(5)	Forzitozid B	0,52 ± 0,01
8	16.67	329	623	461(100),315(8)	Verbaskozid, izomer 1	0,48 ± 0,01
9	18.1	329	623	461(100),315(7)	Izoverbaskozid	tr
10	18.65	333	769	593(100),461(12),447(5),315(5)	Alisonozid	0,244 ± 0,001
11	19.03	334	623	461(100),315(20)	Verbaskozid, izomer 2	0,082 ± 0,001
12	24.72	343	461	285(100)	Luteolin-O-glukuronid	0,26 ± 0,01
Ukupne fenolne kiseline						6,06 ± 0,04
Ukupni fenilpropanoidi						1,33 ± 0,02
Ukupni flavonoidi						0,75 ± 0,01
Uknpo fenolnih jedinjenja						8,16 ± 0,05

tr - količine u tragovima. Standardne kalibracione krive: apigenin-6-C-glukozid ($y = 107025x + 61531$, $R^2 = 0,9989$, LOD = 0,19 $\mu\text{g/mL}$ i LOK = 0,63 $\mu\text{g/mL}$, pikovi 3 i 6); kofeinska kiselina ($y = 388345x + 406369$, $R^2 = 0,999$, LOD = 0,78 $\mu\text{g/mL}$ i LOK = 1,97 $\mu\text{g/mL}$, pikovi 7, 8, 9, 10 i 11); hlorogena kiselina ($y = 168823x - 161172$, $R^2 = 0,9999$, LOD = 0,20 $\mu\text{g/mL}$ i LOK = 0,68 $\mu\text{g/mL}$, pikovi 1, 2, 4 i 5); *p*-kumarinska kiselina ($y = 301950x + 6966,7$, $R^2 = 0,9999$, LOD = 0,68 $\mu\text{g/mL}$ i LOK = 1,61 $\mu\text{g/mL}$, pik 5); kvercetin-3-O-rutinozid ($y = 13343x + 76751$, $R^2 = 0,9998$, LOD = 0,21 $\mu\text{g/mL}$; LOK = 0,71 $\mu\text{g/mL}$, pik 12).

5 OPŠTA DISKUSIJA

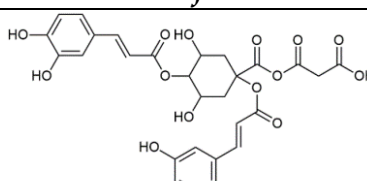
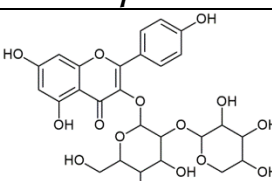
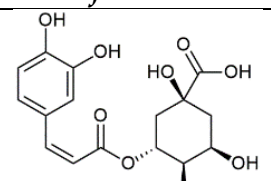
Cilj rada je bio utvrđivanje hemijskog profila metanolnih ekstrakata vrsta biljaka *A. cerefolium*, *O. spinosa* i *P. fruticosa* i određivanje njihovog biološkog potencijala. Analiza hemijskog sastava korišćenjem UHPLC-LTQ-Orbitrap/MS omogućila je identifikovanje većeg broja jedinjenja u poređenju sa brojem kvantifikovanih jedinjenja upotrebom HPLC-DAD/ESI-MSⁿ analize.

Sumirano, kvalitativnom (UHPLC-LTQ-Orbitrap/MS) analizom i hemijskim profilisanjem ekstrakta *A. cerefolium* identifikovano je ukupno 32 jedinjenja (Tabela 21), a od toga njih 17 pripada fenolnim kiselinama i srodnim jedinjenjima, a 15 su flavonoidi. Dvanaest jedinjenja je kvantifikovano (HPLC-DAD/ESI-MSⁿ analizom), od čega deset fenolnih kiselina i dva flavonoida. U poređenju kvalitativnom i kvantitativnom analizom može se zaključiti da je raznovrsnost flavonoida u metanolnom ekstraktu *A. cerefolium* velika, ali da kvantitativno preovlađuju fenolne kiseline.

Kvalitativnom analizom metanolnog ekstrakta *O. spinosa* identifikovano je 63 polifenolnih jedinjenja (Tabela 21): fenolne kiseline (23 jedinjenja), flavonoidi (26 jedinjenja), izoflavonoidi (9 jedinjenja) i druga fenolna jedinjenja (5 jedinjenja). Od ovog broja šesnaest jedinjenja je kvantifikovano: flavonoidi (7), fenolne kiseline (5) i izoflavonoidi (4), gde su kvantitativno daleko najzastupljeniji bili flavonoidi.

Kvalitativnom analizom ekstrakta *P. fruticosa* identifikovana su 44 jedinjenja (Tabela 21) koja pripadaju fenolnim kiselinama (13 jedinjenja), fenilpropanoidima (9 jedinjenja), flavonoidima (20 jedinjenja) i jedinjenjima srodnim fenolima (2 jedinjenja). Kvantitativnom analizom određena je koncentracija dvanaest fenolnih jedinjenja: fenolne kiseline (4 jedinjenja), fenilpropanoidi (5 jedinjenja) i flavonoidi (3 jedinjenja). Ovim analizama je pokazano da iako je raznovrsnost flavonoida velika, koncentracijski su u ekstraktu najzastupljenije fenolne kiseline.

Tabela 21. Pregled dominantnih jedinjenja i odnosa fenolnih kiselina i flavonoida u ispitivanim uzorcima.

vrsta	<i>A. cerefolium</i>	<i>O. spinosa</i>	<i>P. fruticosa</i>
Dominantno jedinjenje	 malonil-1,4-O-dikofeoilhinska kiselina	 kempferol 3-O-(2''-pentozil)heksozid	 3-O-kofeoilhinska kiselina
Ukupan broj jedinjenja	32	63	44
Odnos količina fenolnih kiselina i flavonoida	21 : 1	1 : 7	8 : 1

Imajući u vidu rezultate kvalitativne i kvantitativne analize fenolnih i srodnih jedinjenja metanolnih ekstrakata proučavanih biljaka može se pretpostaviti da ekstrakti svoje biološke aktivnosti ostvaruju preko fenola za koje se može pretpostaviti da su delovali sinergistički i preko različitih i višestrukih mehanizama. Literaturni podaci ukazuju da flavonoidi poseduju antimikrobni potencijal [198]. Antioksidativna aktivnost ispitivanih ekstrakata može se takođe pripisati prisustvu fenolnih jedinjenja. Ranije je otkriveno da neka od jedinjenja ekstrakata identifikovana u ovoj studiji, kao što je apigenin, poseduju inhibitorne aktivnosti na enzim glukozidazu [199]. Takođe, apigenin i luteolin, flavonoidni aglikoni prisutni u ekstraktima poseduju antiholinesterazne aktivnosti [200] dok apigenin 7-*O*-glukozid inhibira i tirozinazu [201]. Iako aglikoni flavonoida u ekstraktima nisu kvantifikovani jer su bili u malim količinama u ukupnom uzorku, nesumljivo je da i u tako malim količinama mogu značajno doprineti biološkoj aktivnosti.

Tabela 22. Pregled bioloških aktivnosti u kojima su ispitivani ekstrakti pokazali najbolju aktivnost.

Testovi	<i>A. cerefolium</i>	<i>O. spinosa</i>	<i>P. fruticosa</i>
Antibakterijska aktivnost			√*
Antibiofilm na <i>S. aureus</i>			√
Inhibicija stafiloksantina			√
Antifungalna aktivnost		√	
Antibiofilm na <i>C. albicans</i>			√
Test sa ergosterolom		√	
DPPH			√
ABTS		√	
FRAP			√
CUPRAC			√
Test sa fosfomolibdatom		√	
Heliranje jona metala	√		
Inhibicija AChE	√		
Inhibicija BChE			√
Inhibicija tirozinaze			√
Inhibicija amilaze		√	
Inhibicija glukozidaze		√	
Antiproliferativna aktivnost		√	
Uticaj na morfologiju A172	√		
Uticaj na Ki67	√		
Antiinflamatorna aktivnost			√

*označava ekstrakt koji je ispoljio najbolju biološku aktivnost u datom testu.

Rezultati antibakterijske aktivnosti ekstrakata ispitivanih vrsta su pokazali da je najbolje antibakterijsko dejstvo na meticilin-rezistentni soj *S. aureus* ispoljio metanolni ekstrakt *P. fruticosa*. Takođe, ekstrakt *P. fruticosa* je inhibirao formiranje biofilma *S. aureus* i pri koncentraciji 1/32 x MIK, dok su ekstrakti *A. cerefolium* i *O. spinosa* inhibirali formiranje biofilma tek pri većoj koncentraciji od 1/8 x MIK. *P. fruticosa* metanolni ekstrakt je takođe

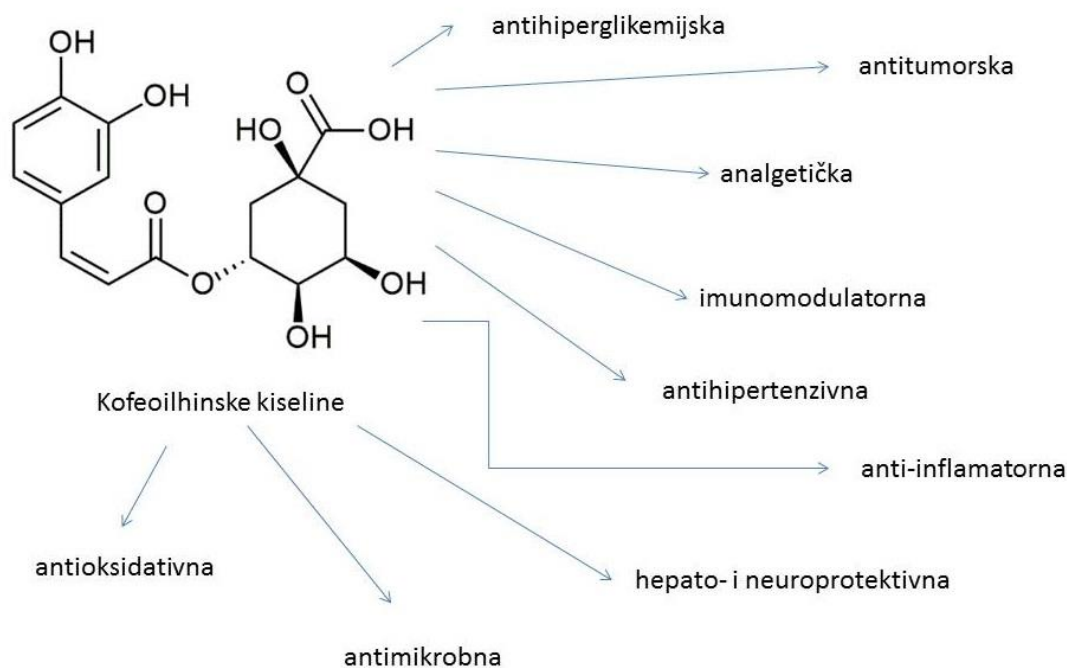
bio jedini od sva tri ispitivana ekstrakta, koji je inhibirao produkciju stafiloksantina pri koncentraciji od 1/16 x MIK. Ekstrakt ove biljke je kao dominantno jedinjenje sadržao *cis* 3-*O*-kofeoilhinsku kiselinu što se može dovesti u vezu sa značajnom antibakterijskom aktivnošću. U testovima za određivanje antioksidativnog potencijala, ekstrakt *P. fruticosa* je imao najbolju aktivnost pokazanu u DPPH, CUPRAC i FRAP testovima. Takođe, najbolju inhibitornu aktivnost na BChE i tirozinazu pokazao je metanolni ekstrakt *P. fruticosa*. Najznačajnije antiinflamatorno delovanje je utvrđeno za ekstrakt *P. fruticosa* (**Tabela 22**). Rezultati ukazuju na to da su navedeni testovi međusobno korelisani i da najznačajnije dejstvo ima *P. fruticosa*, verovatno zbog visoke zastupljenosti *cis* 3-*O*-kofeoilhinske kiseline u ekstraktu. Ekstrakt *A. cerefolium* je kao dominantno jedinjenje sadržao malonil-1,4-*O*-dikofeoilhinsku kiselinu, takođe derivat kofeoilhinskih kiselina, ali u manjoj koncentraciji. Može se pretpostaviti da je postojeća razlika u strukturi derivata kofeoilhinskih kiselina, koje su dominirale i kod *P. fruticosa* i kod *A. cerefolium*, bila od presudnog značaja za pomenute bioaktivnosti gde je *P. fruticosa* ispoljio bolje dejstvo. Naime, derivati dikofeoilhinskih kiselina su bili dominantniji u ekstraktu *A. cerefolium*, dok su kofeoilhinske kiseline dominirale u *P. fruticosa*. Pretpostavlja se da je jedna kofeoil grupa, prisutna u dominantnim jedinjenjima *P. fruticosa*, bila od presudnog značaja za ispoljenu bolju bioaktivnost u odnosu na dve kofeoil grupe prisutne u dominantnim fenolnim kiselinama *A. cerefolium*. Takođe, u navedenim testovima je *P. fruticosa* ispoljio bolje dejstvo od *O. spinosa*, u kome je dominantno jedinjenje bilo flavonoid, sa kompleksnijom hemijskom strukturom u odnosu na *cis* 3-*O*-kofeoilhinsku kiselinu i očigledno manjom bioaktivnošću u navedenim testovima. Takođe je primetno da je odnos fenolnih kiselina i flavonoida u ispitivanim ekstraktima bio različit (**Tabela 21**): količina fenolnih kiselina bila je 21 put veća od količine flavonoida kod *A. cerefolium*, 8 puta veća kod *P. fruticosa*, dok je kod *O. spinosa* bilo obrnuto, flavonoidi su dominirali nad fenolnim kiselinama u odnosu 7:1. Odnos prisutnih grupa jedinjenja u ekstraktima je nesumnjivo imao uticaj na ispoljenu biološku aktivnost ekstrakata. Kada su u pitanju rezultati antibakterijske aktivnosti, jasno je da su fenolne kiseline prisutne u *P. fruticosa* ispoljile bolje dejstvo od flavonoida koji su dominirali u *O. spinosa* - fenolne kiseline su manji molekuli koji zbog svoje polarno-nepolarne strukture lakše prodiru u bakterijsku ćeliju.

Rezultati za antifungalnu aktivnost ekstrakata upućuju na najizraženije dejstvo ekstrakta *O. spinosa* prema humanom patogenu *A. fumigatus*, sa čak i nižim inhibitornim i fungicidnim koncentracijama u odnosu na komercijalne antimikotike. Takođe, metanolni ekstrakt *O. spinosa* je pokazao da jedini ostvaruje fungicidni efekat na *Candida albicans* narušavanjem biosintetskog puta ergosterola. Prethodna istraživanja dokazuju da aglikoni flavonoida i glikozilovani derivati mogu smanjiti ekspresiju gena *ERG11* kod *C. albicans* koji je ključan za sintezu enzima lanosterol 14 α -demetilaze, što dovodi do narušavanja biosintetskog puta ergosterola [108]. Što se tiče antioksidativne aktivnosti, ekstrakt *O. spinosa* je ispoljio najbolje dejstvo u ABTS testu i testu sa fosfomolibdatom. Metanolni ekstrakt *O. spinosa* je delovao inhibitorno na sve testirane enzime, a u poređenju sa ostalim ispitivanim ekstraktima najbolje je inhibirao enzim amilazu i jedini koji je inhibirao glukozidazu; enzime čiji se inhibitori koriste u terapiji dijabetesa. Takođe, najizraženiji antiproliferativni efekat prema svim ispitivanim tumorskim ćelijskim linijama je imao ekstrakt *O. spinosa* u poređenju sa ekstraktima *A. cerefolium* i *P. fruticosa*. Navedeni testovi bioaktivnosti, u kojima se *O. spinosa* pokazao kao najbolji (**Tabela 22**), upućuju na međusobnu korelaciju. Pretpostavlja se da je identifikovani dominantni flavonoid, kempferol 3-*O*-(2"-pentozil)heksozid, u ekstraktu *O. spinosa*, odgovaran za najbolje dejstvo

ovog ekstrakta u navedenim testovima, ali ne može se isključiti sinergističko dejstvo sa drugim komponentama u ekstraktu.

A. cerefolium je ispoljio najbolje dejstvo u testu heliranja metala, kao i najbolje inhibitorno dejstvo na enzim AChE. Iako ekstrakt navedene vrste nije posedovao najbolji citotoksični efekat, *A. cerefolium* je bio jedini koji je uticao na morfološke promene u A172 ćelijama glioblastoma, koje mogu upućivati na aktivaciju apoptotskog mehanizma. Pretpostavlja se da su u ovim testovima, gde je zabeleženo najbolje dejstvo ekstrakta *A. cerefolium* (Tabela 22), dve kofeoil grupe dominantnog jedinjenja imale značajnu bioaktivnu ulogu. Interesnatno je spomenuti da je ovo ekstrakt koji je imao najveći broj fenolnih kiselina, kao i to da je udeo fenolnih kiselina bio gotovo 21 puta veći od udela flavonoida.

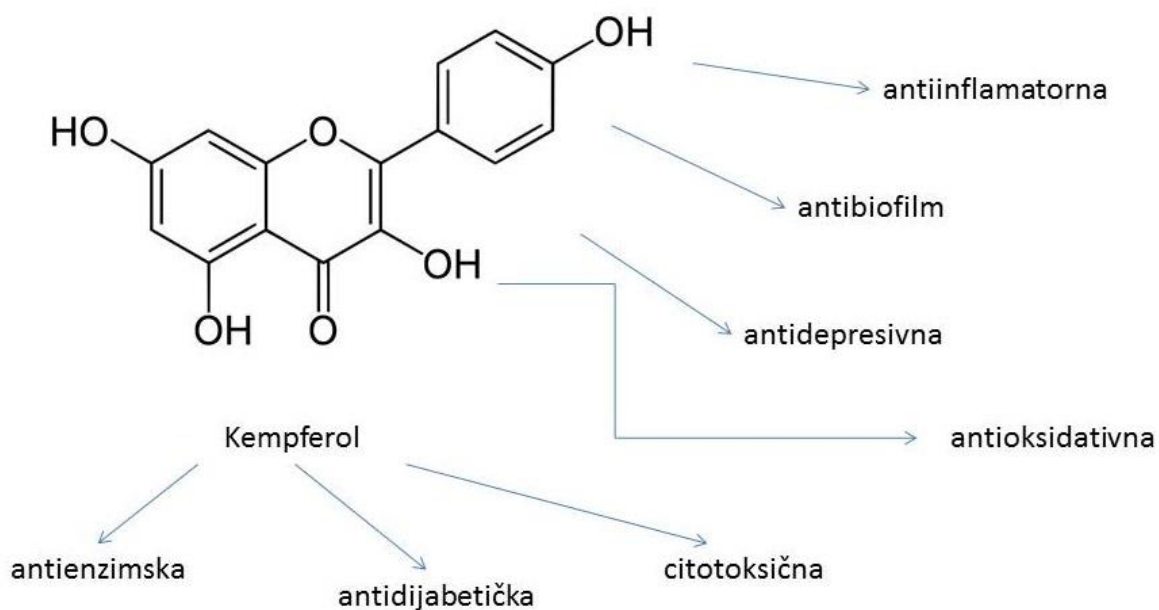
Sumirano posmatrano, najbolje i najviše bioaktivnosti su dokazane za ekstrakt *P. fruticosa* u kome su dominirale fenolne kiseline i to derivati kofeoilhinskih kiselina. Takođe, za značajno bolju antifungalnu i citotoksičnu aktivnost *O. spinosa*, u odnosu na sve testirane ekstrakte, je verovatno odgovoran dominantan flavonoid ili sinergizam velikog broja flavonoida prisutnih u ovom ekstraktu. Prethodno je pokazano i da izoflavonoidi poseduju širok spektar bioloških aktivnosti uključujući antimutagenu, antikancerogenu, antiproliferativnu aktivnost [202], pa shodno tome biološki potencijal *O. spinosa* se može delimično pripisati i ovoj grupi jedinjenja. Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji ukazuju na značajno bolji antibakterijski, antioksidativni, antineurodegenerativni i anti-inflamatorni potencijal prisutnih kofeoilhinskih kiselina u poređenju sa flavonoidima. S druge strane, aktivnost prisutnih derivata flavonoida je bolja u testovima antifungalne i citotoksične aktivnosti, uzimajući u obzir eukariotsku strukturu gljiva i humanih ćelija.



Slika 36. Dokazane biološke aktivnosti kofeoilhinskih kiselina

U ekstraktima je u većim količinama zabeleženo prisustvo fenolnih kiselina, koje takođe mogu biti odgovorne za biološku aktivnost ekstrakata koja je pokazana u ovom radu. Biološka aktivnost ekstrakata *A. cerefolium* i *P. fruticosa* predstavljena u ovoj studiji mogu se barem delimično pripisati prisustvu najdominantnijih jedinjenja u ovim ekstraktima: malonil-1,4-*O*-dikofeoilhinske i *cis* 3-*O*-kofeoilhinske kiseline, redom. Kofeoilhinske kiseline se nalaze i u mnogim jestivim biljnim vrstama i one pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti, uključujući antioksidativnu, imunomodulatornu, antihipertenzivnu, analgetičku, anti-inflamatornu, hepato- i neuroprotektivnu, antihiperglikemijsku, antitumorsku i antimikrobnu (**Slika 36**) [203].

S obzirom da je dominantno jedinjenje u ekstraktu *O. spinosa* bilo derivat kempferola, može se zaključiti da je za biološku aktivnost koju je ispoljio ovaj ekstrakt makar delimično odgovorno ovo jedinjenje. Pokazano je da kempferol predstavlja polaznu tačku za razvoj novih lekova protiv mikrobnog biofilma, kao i da može smanjiti rizik od rezistencije bakterija na lekove, inhibirajući biofilm *Staphylococcus aureus* [204]. Kempferol ispoljava antidepresivne efekte, delimično zahvaljujući svojim antioksidativnim i anti-inflamatornim svojstvima [205]. Takođe, ispoljava i snažnu antioksidativnu aktivnost na eritrocite [206]. Kempferol se može koristiti za podsticanje metabolizma glukoze u skeletnim mišićima i inhibiranje glukoneogeneze u jetri, pokazujući antidijabetičko dejstvo [207]. Smatra se prirodnim antidijabetičkim jedinjenjem koje deluje tako što sprečava proizvodnju glukoze i povećava osetljivost na insulin [208]. Takođe, pretpostavlja se da se supresija glukoneogeneze u jetri kempferolom ostvaruje preko direktnog inhibitornog dejstva na enzimsku aktivnost piruvat karboksilaze [207]. Ovo jedinjenje deluje kao citotoksični agens u MFE-280 ćelijama karcinoma endometrijuma putem indukcije apoptoze, zaustavljanja ćelijskog ciklusa i inhibicije mTOR/PI3K/Akt signalnog puta [209]. Takođe, inhibira proliferaciju, migraciju i invaziju HepG2 tumorskih ćelija putem regulacije mikroRNK-21 [210]. Kempferol ispoljava anti-inflamatorni efekat tako što smanjuje ekspresiju proinflamatornih citokina [211] (**Slika 37**).



Slika 37. Dokazane biološke aktivnosti kempferola

6 ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata predstavljenih u ovoj doktorskoj disertaciji mogu se izvući sledeći zaključci:

- Antibakterijski efekat ekstrakata zavisi od testiranog soja i ne može se pripisati razlikama u sastavu ćelijskog zida Gram negativnih i Gram pozitivnih bakterija. Metanolni ekstrakt *P. fruticosa* ispoljio je najbolje baktericidno dejstvo na rezistentan soj MRSA (MBK= 1,25 mg/mL), u poređenju sa ekstraktima *A. cerefolium* (MBK= 2,50 mg/mL) i *O. spinosa* (MBK= 10,00 mg/mL). Sa druge strane, metanolni ekstrakt *O. spinosa* se pokazao kao aktivniji protiv rezistentnog soja *E. coli* (MIK= 1,25 mg/mL) u odnosu na metanolne ekstrakte *A. cerefolium* i *P. fruticosa* (MIK= 2,50 mg/mL). Kao jedan od najrezistentnijih sojeva na dejstvo ekstrakata se izdvojio soj *S. Typhimurium*
- Svi testirani ekstrakti imaju veći potencijal inhibicije formiranja biofilma *S. aureus* u poređenju sa komercijalnim antibiotikom streptomycinom
- Inhibicija produkcije stafiloksantina zavisila je od primenjenog ekstrakta. Ekstrakt *A. cerefolium* nije inhibirao proizvodnju stafiloksantina u *S. aureus* pri svim testiranim sub-inhibitornim koncentracijama. Za razliku od krbuljice, ekstrakt *O. spinosa* je doveo do smanjenja proizvodnje stafiloksantina pri koncentraciji od $1/2 \times \text{MIK}$ i $1/4 \times \text{MIK}$. Rezultati dobijeni za metanolni ekstrakt *P. fruticosa* su pokazali da je najizraženija inhibicija proizvodnje stafiloksantina postignuta pri $1/2 \times \text{MIK}$, dok inhibicija nije zabeležena pri $1/32 \times \text{MIK}$. Dobijeni rezultati su po prvi put pokazali inhibitorno delovanje ekstrakta zečjeg trna na proizvodnju stafiloksantina. Takođe, u okviru ove doktorske disertacije je pokazano da prirodni agensi mogu značajno uticati na proizvodnju faktora virulencije patogenih bakterija, što može predstavljati jednu od važnih strategija prilikom formulacije novih antibakterijskih agenasa
- Dobijeni rezultati ukazuju na antifungalni potencijal sva tri testirana ekstrakta. Ekstrakt biljke *O. spinosa* pokazao je izraženiji antifungalni potencijal u poređenju sa ekstraktima *A. cerefolium* i *P. fruticosa*. Kao najznačajniji rezultat može se izdvojiti dejstvo ekstrakta *O. spinosa* na *A. fumigatus* (MIK= 0,08; MFK= 0,08) na koje su komercijalni antifungalni lekovi ketokonazol (MIK= 0,20; MFK= 0,50) i bifonazol (MIK= 0,15; MFK= 0,20) pokazali daleko slabiju aktivnost.
- Rezultati dobijeni proučavanjem antibiofilm potencijala ekstrakata biljaka *A. cerefolium*, *O. spinosa* i *P. fruticosa* ukazuju na značajan antibiofilm potencijal ispitivanih ekstrakata. Prema pregledu literature, dobijeni rezultati predstavljaju prve rezultate o antibiofilm potencijalu vrsta iz roda *Anthriscus*, kao i o antibiofilm aktivnosti ekstrakta *O. spinosa* dobijenog iz nadzemnih delova biljke. Takođe, pregled literature je pokazao da je ovo prvo istraživanje o antibiofilm aktivnosti ekstrakta *P. fruticosa*.
- Sva tri metanolna ekstrakta ispitivanih biljnih vrsta su narušavala integritet ćelijske membrane kvasca *C. albicans*

- U prisustvu ekstrakta *O. spinosa* dolazi do narušavanja biosintetičkog puta ergosterola. Metanolni ekstrakti biljaka *A. cerefolium* i *P. fruticosa* ne utiču na biosintetski put ergosterola
- Najizraženiji antioksidativni potencijal među testiranim ekstraktima je ispoljio metanolni ekstrakt *P. fruticosa*
- Najizraženiji enzim-inhibitorski potencijal je pokazao ekstrakt biljke *O. spinosa*, delujući inhibitorski na sve testirane enzime (AChE, BChE, tirozinaza, amilaza i glukozidaza)
- Testirani ekstrakti nisu pokazali citotoksičnost prema primarnim ćelijama HGF1, dok se metanolni ekstrakt *O. spinosa* pokazao kao najefikasniji prema tumorskim ćelijskim linijama
- Stopa proliferacije A172 ćelija tretiranih ekstraktima *A. cerefolium* i *O. spinosa* bila smanjena u poređenju sa stopom proliferacije kontrolnih ćelija.
- Tretman A172 ćelija sa ekstraktom *A. cerefolium* indukovao je promenu morfologije ovih ćelija
- Najznačajniju anti-inflamatornu aktivnost pokazao je ekstrakt *P. fruticosa*
- U poređnom kvalitativnom i kvantitativnom hemijskom analizom može se zaključiti da je raznovrsnost flavonoida u metanolnom ekstraktu *A. cerefolium* velika, ali da kvantitativno preovlađuju fenolne kiseline, sa najdominantnijim jedinjenjem malonil-1,4-*O*-dikofeoilhinskom kiselinom. Kvalitativnom analizom metanolnog ekstrakta *O. spinosa* identifikovano je 63 polifenolnih jedinjenja: fenolne kiseline, flavonoidi, izoflavonoidi, gde su kvantitativno bili najzastupljeniji flavonoidi sa dominantnim jedinjenjem kempferol 3-*O*-(2"-pentozil)heksozidom. Kvalitativnom analizom ekstrakta *P. fruticosa* identifikovano je 44 jedinjenja koja pripadaju fenolnim kiselinama, fenilpropanoidima i flavonoidima. Kvantitativnom analizom je pokazano da iako je raznovrsnost flavonoida veća, koncentracijski su u ekstraktu najzastupljenije fenolne kiseline sa dominantnim jedinjenjem *cis* 3-*O*-kofeoilhinskom kiselinom.
- Biološka aktivnost ekstrakata *A. cerefolium*, *O. spinosa* i *P. fruticosa* predstavljena u ovoj studiji može se barem delimično pripisati prisustvu najdominantnijih jedinjenja u ekstraktima: malonil-1,4-*O*-dikofeoilhinske, kempferol 3-*O*-(2"-pentozil)heksozid i *cis* 3-*O*-kofeoilhinske kiseline, redom.
- Dobijeni rezultati predstavljaju dobru osnovu za dalja *in vivo* ispitivanja na laboratorijskim životinjama kako bi se biološki potencijal ekstrakata testiranih vrsta potvrdio i iskoristio na najbolji mogući način za tretman određenih medicinskih stanja.

7 LITERATURA

1. Petrovska, B.B. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn. Rev.* **2012**, 6, 1, doi:10.4103/0973-7847.95849.
2. Falodun, A. Herbal medicine in Africa-distribution, standardization and prospects. *Res. J. Phytochem.* **2010**, 4, 154-161, doi:10.3923/RJPHYTO.2010.154.161.
3. Houghton, P. Ethnopharmacology of medicinal plants: Asia and the Pacific. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2007**, 64, 248, doi:10.1111/J.1365-2125.2007.02888.X.
4. Atanasov, A.G.; Waltenberger, B.; Pferschy-Wenzig, E.M.; Linder, T.; Wawrosch, C.; Uhrin, P.; Temml, V.; Wang, L.; Schwaiger, S.; Heiss, E.H.; et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol. Adv.* **2015**, 33, 1582-1614, doi:10.1016/J.BIOTECHADV.2015.08.001.
5. Alamgir, A.N.M. Pharmacopoeia and herbal monograph, the aim and use of WHO's herbal monograph, WHO's guide lines for herbal monograph, pharmacognostical research and monographs of organized, unorganized drugs and drugs from animal sources. *Prog. Drug Res.* **2017**, 73, 295-353, doi:10.1007/978-3-319-63862-1_7.
6. Farooqi, A.A.; Srinivasappa, K.N. Chervil. In *Handbook of Herbs and Spices: Second Edition*; Elsevier Inc., **2012**; Vol. 2, pp. 268-274 ISBN 9780857095688.
7. Vyas, A.; Shukla, S.S.; Pandey, R.; Jain, V.; Joshi, V.; Gidwani, B. Chervil: A multifunctional miraculous nutritional herb. *Asian J. Plant Sci.* **2012**, 11, 163-171, doi:10.3923/ajps.2012.163.171.
8. Tanaka, T. *Tanaka's Cyclopedia of Edible Plants of the World*; 1st ed.; Keigaku Pub. Co.: Japan, **1976**.
9. Lentini, F.; Venza, F. Wild food plants of popular use in Sicily. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **2007**, 3, 1-12, doi:10.1186/1746-4269-3-15/TABLES/2.
10. Altuner EM, Ceter T, I.C. Investigation of antifungal activity of *Ononis spinosa* L. ash used for the therapy of skin infections as folk remedie. *Mikrobiyol Bul.* **2010**, 44, 633-639.
11. Amor, I.L. Ben; Boubaker, J.; Sgaier, M. Ben; Skandrani, I.; Bhourri, W.; Neffati, A.; Kilani, S.; Bouhleb, I.; Ghedira, K.; Chekir-Ghedira, L. Phytochemistry and biological activities of *Phlomis* species. *J. Ethnopharmacol.* **2009**, 125, 183-202.
12. Nikolic, V. Rod *Anthriscus* Pers. In *Flora SR Srbije V*; M., J., Ed.; Srpska akademija nauka i umetnosti: Beograd, **1973**; pp. 334-338.
13. Vdovenko-Martynova, N.N.; Bezrodnova, E.I.; Kruglaya, A.A.; Soromytko, Y.V. Morphological-anatomic study of *Anthriscus cerefolium* ((L.) Hoffm.) in the Caucasian mineral water region. *Int. J. Appl. Fundam. Res. (Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований)* **2018**, 132-136, doi:10.17513/MJPF1.12122.
14. Diklić, N. Rod *Ononis* L., In *Flora SR Srbije IV*; Josifović, M., Ed.; Srpska akademija nauka i umetnosti: Beograd, **1972**; pp. 392-396.

15. Monica Gabriela, T.; Dumitru, L.; George Dan, Mogo. Histo-anatomical study on the root of *Ononis spinosa* L. *Oltenia. Stud. úi comuniccri. ùtiinnele Naturii. Tom* **2010**, 26.
16. Diklić, N. Rod *Phlomis* L. In *Flora SR Srbije VI*; Josifović, M., Ed.; Srpska akademija nauka i umetnosti: Beograd, **1974**; pp. 383–384.
17. Boratynski, A., Browicz, K., Zielinski, J. *Chorology of trees and shrubs in Greece*; Polish Academy of Sci. Institute of Dendrology: Kornik, Poland, **1992**.
18. Kyparissis, A.; Grammatikopoulos, G.; Manetas, Y. Leaf demography and photosynthesis as affected by the environment in the drought semi-deciduous Mediterranean shrub *Phlomis fruticosa* L. *Acta Oecologica* **1997**, 18, 543–555, doi:10.1016/S1146-609X(97)80040-9.
19. Pyykkö, M. *The leaf anatomy of east Patagonian xeromorphic plants*; Societas Zoologica Botanica Fennica Vanamo: Helsinki, **1966**.
20. Christodoulakis, N.S. An anatomical study of seasonal dimorphism in the leaves of *Phlomis fruticosa*. *Ann. Bot.* **1989**, 63, 389–394, doi:10.1093/OXFORDJOURNALS.AOB.A087757.
21. Psaras, G.K.; Diamantopoulos, G.S.; Makrypoulias, C.P. Chloroplast arrangement along intercellular air spaces. *Isr. J. Plant Sci.* **1996**, 44, 1–9, doi:10.1080/07929978.1996.10676627.
22. Psaras, G.K.; Sofroniou, I. Stem and root wood anatomy of the shrub *Phlomis fruticosa* (Labiatae).. *IAWA J.* **2004**, 25, 71–77, doi:10.1163/22941932-90000350.
23. Ewers, F.W.; Carlton, M.R.; Fisher, J.B.; Kolb, K.J.; Tyree, M.T. Vessel diameters in roots versus stems of tropical lianas and other growth forms. *IAWA J.* **1997**, 18, 261–279, doi:10.1163/22941932-90001490.
24. Carlquist, S. Ecological factors in wood evolution: A floristic approach. *Am. J. Bot.* **1977**, 64, 887–896, doi:10.1002/J.1537-2197.1977.TB11932.X.
25. Ghedira, K.; Goetz, P. *Ononis spinosa* L. : Bugrane épineuse (Fabaceae). *Phytothérapie* **2015**, 13, 45–48, doi:10.1007/S10298-015-0919-6.
26. Facciola, S. *Cornucopia: a source book of edible plants*. Kampong Publications, Vista, California, **1990**, 677.
27. Ergene Öz, B.; Saltan İřcan, G.; Küpeli Akkol, E.; Süntar, İ.; Keleş, H.; Bahadır Acıkara, Ö. Wound healing and anti-inflammatory activity of some *Ononis* taxons. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, 91, 1096–1105, doi:10.1016/J.BIOPHA.2017.05.040.
28. Carmona, M.D.; Llorach, R.; Obon, C.; Rivera, D. “Zahraa”, a Unani multicomponent herbal tea widely consumed in Syria: components of drug mixtures and alleged medicinal properties. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, 102, 344–350, doi:10.1016/J.JEP.2005.06.030.
29. Novais, M.H.; Santos, I.; Mendes, S.; Pinto-Gomes, C. Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *J. Ethnopharmacol.* **2004**, 93, 183–195, doi:10.1016/J.JEP.2004.02.015.

30. González-Tejero, M.R.; Molero-Mesa, J.; Casares-Porcel, M.; Lirola, M.J.M. New contributions to the ethnopharmacology of Spain. *J. Ethnopharmacol.* **1995**, *45*, 157–165, doi:10.1016/0378-8741(94)01208-H.
31. Pardo De Santayana, M.; Blanco, E.; Morales, R. Plants known as té in Spain: an ethno-pharmaco-botanical review. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *98*, 1–19, doi:10.1016/J.JEP.2004.11.003.
32. Tardío, J.; Pardo-De-Santayana, M.; Morales, R. Ethnobotanical review of wild edible plants in Spain. *Bot. J. Linn. Soc.* **2006**, *152*, 27–71, doi:10.1111/J.1095-8339.2006.00549.X.
33. Vázquez, F.M.; Suarez, M.A.; Pérez, A. Medicinal plants used in the Barros Area, Badajoz Province, Spain. *J. Ethnopharmacol.* **1997**, *55*, 81–85, doi:10.1016/S0378-8741(96)01491-2.
34. Adedeji, W.A. The treasure called antibiotics. *Ann. Ibadan Postgrad. Med.* **2016**, *14*, 56.
35. Cassini, A.; Högberg, L.D.; Plachouras, D.; Quattrocchi, A.; Hoxha, A.; Simonsen, G.S.; Colomb-Cotinat, M.; Kretzschmar, M.E.; Devleeschauwer, B.; Cecchini, M.; et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect. Dis.* **2019**, *19*, 56–66, doi:10.1016/S1473-3099(18)30605-4.
36. Yoshikawa, T.T. Antimicrobial resistance and aging: beginning of the end of the antibiotic era? *J. Am. Geriatr. Soc.* **2002**, *50*, 226–229, doi:10.1046/J.1532-5415.50.7S.2.X.
37. Aleksić, M.; Stanisavljević, D.; Smiljković, M.; Vasiljević, P.; Stevanović, M.; Soković, M.; Stojković, D. Pyrimethanil: Between efficient fungicide against *Aspergillus* rot on cherry tomato and cytotoxic agent on human cell lines. *Ann. Appl. Biol.* **2019**, *175*, doi:10.1111/aab.12532.
38. Rex, J.H.; Bennett, J.E.; Sugar, A.M.; Pappas, P.G.; van der Horst, C.M.; Edwards, J.E.; Washburn, R.G.; Scheld, W.M.; Karchmer, A.W.; Dine, A.P.; et al. A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia in patients without neutropenia. Candidemia Study Group and the National Institute. *N. Engl. J. Med.* **1994**, *331*, 1325–1330, doi:10.1056/NEJM199411173312001.
39. Brauer, V.S.; Rezende, C.P.; Pessoni, A.M.; De Paula, R.G.; Rangappa, K.S.; Nayaka, S.C.; Gupta, V.K.; Almeida, F. Antifungal agents in agriculture: Friends and foes of public health. *Biomolecules* **2019**, *9*, doi:10.3390/BIOM9100521.
40. Shuping, D.S.S.; Eloff, J.N. The use of plants to protect plants and food against fungal pathogens: A review. *African J. Tradit. Complement. Altern. Med. AJTCAM* **2017**, *14*, 120–127, doi:10.21010/AJTCAM.V14I4.14.
41. Sagué, C.M.B.; Jarvis, W.R. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. *J. Infect. Dis.* **1993**, *167*, 1247–1251, doi:10.1093/INFDIS/167.5.1247.

42. Alanis, A.J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch. Med. Res.* **2005**, *36*, 697–705, doi:10.1016/J.ARCMED.2005.06.009.
43. Lai, P.; Rao, H.; Gao, Y. Chemical composition, cytotoxic, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil from *Anthriscus caucalis* M. Bieb grown in China. *Rec. Nat. Prod.* **2018**, *12*, 290–294, doi:10.25135/rnp.31.17.07.046.
44. Pavlović, M.; Petrović, S.; Milenković, M.; Couladis, M.; Tzakou, O.; Niketić, M. Chemical composition and antimicrobial activity of *Anthriscus nemorosa* root essential oil. *Nat. Prod. Commun.* **2011**, *6*, 271–273, doi:10.1177/1934578x1100600229.
45. Stojković, D.; Barros, L.; Petrović, J.; Glamoclija, J.; Santos-Buelga, C.; Ferreira, I.C.F.R.; Soković, M. Ethnopharmacological uses of *Sempervivum tectorum* L. in southern Serbia: Scientific confirmation for the use against otitis linked bacteria. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *176*, doi:10.1016/j.jep.2015.11.014.
46. Popović, V.; Stojković, D.; Nikolić, M.; Heyerick, A.; Petrović, S.; Soković, M.; Niketić, M. Extracts of three *Laserpitium* L. species and their principal components laserpitine and sesquiterpene lactones inhibit microbial growth and biofilm formation by oral *Candida* isolates. *Food Funct.* **2015**, *6*, 1205–1211, doi:10.1039/c5fo00066a.
47. Kukić, J.; Popović, V.; Petrović, S.; Mucaji, P.; Ćirić, A.; Stojković, D.; Soković, M. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. *Food Chem.* **2008**, *107*, doi:10.1016/j.foodchem.2007.09.005.
48. Stojković, D.S.; Živković, J.; Soković, M.; Glamočlija, J.; Ferreira, I.C.F.R.; Janković, T.; Maksimović, Z. Antibacterial activity of *Veronica montana* L. extract and of protocatechuic acid incorporated in a food system. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *55*, 209–213, doi:10.1016/j.fct.2013.01.005.
49. Živković, J.; Barreira, J.C.M.; Stojković, D.; Ćebović, T.; Santos-Buelga, C.; Maksimović, Z.; Ferreira, I.C.F.R. Phenolic profile, antibacterial, antimutagenic and antitumour evaluation of *Veronica urticifolia* Jacq. *J. Funct. Foods* **2014**, *9*, doi:10.1016/j.jff.2014.04.024.
50. Hadžifejzović, N.; Kukić-Marković, J.; Petrović, S.; Soković, M.; Glamočlija, J.; Stojković, D.; Nahrstedt, A. Bioactivity of the extracts and compounds of *Ruscus aculeatus* L. and *Ruscus hypoglossum* L. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *49*, doi:10.1016/j.indcrop.2013.05.036.
51. Altanlar, N.; Saltan Çitoğlu, G.; Sever Yılmaz, B.; İçin Saltan, G.C.; Sever Yılmaz, B. Antilisterial activity of some plants used in folk medicine. *Pharm. Biol.* **2006**, *44*, 91–94, doi:10.1080/13880200600591907.
52. Baldemir, A.; Köroğlu, A.; Altanlar, N.; Coşkun, M. A Comparative study on the *in vitro* antioxidant and antimicrobial potentials of three endemic *Ononis* L. species from Turkey. *Turkish J. Pharm. Sci.* **2018**, *15*, 125–129, doi:10.4274/TJPS.62533.
53. Amin Jaradat, N.; Al-Masri, M.; Zaid, A.N.; Hussein, F.; Al-Rimawi, F.; Mokh, A.A.; Mokh, J.A.; Ghonaim, S. Phytochemical, antimicrobial and antioxidant preliminary screening of a traditional Palestinian medicinal plant, *Ononis pubescens* L. **2017**,

doi:10.1016/j.eujim.2017.08.012.

54. Dénes, T.; Bartha, S.G.; Kerényi, M.; Varga, E.; Balázs, V.L.; Csepregi, R.; Papp, N. Histological and antimicrobial study of *Ononis arvensis* L. *Acta Biol. Hung.* **2017**, *68*, 321–333, doi:10.1556/018.68.2017.3.9.
55. Yerlikaya, S.; Zengin, G.; Mollica, A.; Baloglu, M.C.; Altunoglu, Y.C.; Aktumsek, A. A Multidirectional perspective for novel functional products: *In vitro* pharmacological activities and *in silico* studies on *Ononis natrix* subsp. *hispanica*. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, doi:10.3389/FPHAR.2017.00600.
56. Deliorman Orhan, D.; Özçelik, B.; Hoşbaş, S.; Vural, M. Assessment of antioxidant, antibacterial, antimycobacterial, and antifungal activities of some plants used as folk remedies in Turkey against dermatophytes and yeast-like fungi. *Turk J Biol* **2012**, *36*, 672–686, doi:10.3906/biy-1203-33.
57. Morteza-Semnani, K.; Azadbakht, M.; Goodarzi, A. The essential oils composition of *Phlomis herba-venti* L. leaves and flowers of Iranian origin. *Flavour Fragr. J.* **2004**, *19*, 29–31, doi:10.1002/FFJ.1268.
58. Morteza-Semnani, K.; Saeedi, M. The essential oil composition of *Phlomis bruguieri* Desf. from Iran. *Flavour Fragr. J.* **2005**, *20*, 344–346, doi:10.1002/FFJ.1459.
59. Demirci, F.; Guven, K.; Demirci, B.; Dadandi, M.Y.; Baser, K.H.C. Antibacterial activity of two *Phlomis* essential oils against food pathogens. *Food Control* **2008**, *19*, 1159–1164, doi:10.1016/J.FOODCONT.2008.01.001.
60. Ristic, MD.; Duletic-Lausevic, S.; *et al.* Antimicrobial activity of essential oils and ethanol extract of *Phlomis fruticosa* L. (Lamiaceae). *Phytother. Res.* **2000**, *14*, doi:10.1002/1099-1573(200006)14:4<267::AID-PTR644>3.0.CO;2-7.
61. López, V.; Akerreta, S.; Casanova, E.; García-Mina, J.M.; Cavero, R.Y.; Calvo, M.I. *In vitro* antioxidant and anti-rhizopus activities of Lamiaceae herbal extracts. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2007**, *62*, 151–155, doi:10.1007/S11130-007-0056-6.
62. Rahman, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin. Interv. Aging* **2007**, *2*, 219–236.
63. Caroch, M.; Ferreira, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *51*, 15–25, doi:10.1016/J.FCT.2012.09.021.
64. Aseervatham, G.S.B.; Sivasudha, T.; Jeyadevi, R.; Arul Ananth, D. Environmental factors and unhealthy lifestyle influence oxidative stress in humans--an overview. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2013**, *20*, 4356–4369, doi:10.1007/S11356-013-1748-0.
65. Lobo, V.; Patil, A.; Phatak, A.; Chandra, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* **2010**, *4*, 118–126.
66. Yan, L.L.; Zaher, H.S. How do cells cope with RNA damage and its consequences? *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 15158–15171, doi:10.1074/JBC.REV119.006513.

67. Juan, C.A.; de la Lastra, J.M.P.; Plou, F.J.; Pérez-Lebeña, E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *Vol. 22*, Page 4642 **2021**, *22*, 4642, doi:10.3390/IJMS22094642.
68. Pizzino, G.; Irrera, N.; Cucinotta, M.; Pallio, G.; Mannino, F.; Arcoraci, V.; Squadrito, F.; Altavilla, D.; Bitto, A. Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, doi:10.1155/2017/8416763.
69. Vona, R.; Pallotta, L.; Cappelletti, M.; Severi, C.; Matarrese, P. The impact of oxidative stress in human pathology: Focus on gastrointestinal disorders. *Antioxidants* **2021**, *Vol. 10*, Page 201 **2021**, *10*, 201, doi:10.3390/ANTIOX10020201.
70. Ivanov, M.; Božunović, J.; Gašić, U.; Drakulić, D.; Stevanović, M.; Rajčević, N.; Stojković, D. Bioactivities of *Salvia nemorosa* L. inflorescences are influenced by the extraction solvents. *Ind. Crops Prod.* **2022**, *175*, 114260, doi:10.1016/J.INDCROP.2021.114260.
71. Mirkov, I.; Stojković, D.; Aleksandrov, A.P.; Ivanov, M.; Kostić, M.; Glamočlija, J.; Soković, M. Plant extracts and isolated compounds reduce parameters of oxidative stress induced by heavy metals: An up-to-date review on animal studies. *Curr. Pharm. Des.* **2020**, *26*, 1799–1815, doi:10.2174/1381612826666200407163408.
72. Petropoulos, S.; Fernandes, Â.; Stojković, D.; Pereira, C.; Taofiq, O.; Di Gioia, F.; Tzortzakis, N.; Soković, M.; Barros, L.; Ferreira, I.C.F.R. Cotton and cardoon byproducts as potential growing media components for *Cichorium spinosum* L. commercial cultivation. *J. Clean. Prod.* **2019**, *240*, doi:10.1016/j.jclepro.2019.118254.
73. Žemlička, L.; Fodran, P.; Lukeš, V.; Vagánek, A.; Slováková, M.; Staško, A.; Dubaj, T.; Liptaj, T.; Karabín, M.; Birošová, L.; et al. Physicochemical and biological properties of luteolin-7-O- β -d-glucoside (cynaroside) isolated from *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. *Monatshefte fur Chemie* **2014**, *145*, 1307–1318, doi:10.1007/s00706-014-1228-3.
74. Jovanova, B.; Kulevanova, S.; Kadifkova Panovska, T. Determination of the total phenolic content, antioxidant activity and cytotoxicity of selected aromatic herbs. *Agric. Conspec. Sci.* **2019**, *84*, 51–58.
75. Çoban, T.; Çitoğlu, G.S.; Sever, B.; Işcan, M. Antioxidant activities of plants used in traditional medicine in Turkey. *Pharm. Biol.* **2003**, *41*, 608–613, doi:10.1080/13880200390501974.
76. Mezrag, A.; Malafrente, N.; Bouheroum, M.; Travaglino, C.; Russo, D.; Milella, L.; Severino, L.; De Tommasi, N.; Braca, A.; Dal Piaz, F. Phytochemical and antioxidant activity studies on *Ononis angustissima* L. aerial parts: isolation of two new flavonoids. *Nat. Prod. Res.* **2017**, *31*, 507–514, doi:10.1080/14786419.2016.1195381.
77. Al-Qudah, M.A.; Al-Ghoul, A.M.; Trawenh, I.N.; Al-Jaber, H.I.; Al Shboul, T.M.; Abu Zarga, M.H.; Abu orabi, S.T. Antioxidant activity and chemical composition of essential oils from Jordanian *Ononis natrix* L. and *Ononis sicula* Guss. *J. Biol. Act. Prod. from Nat.* **2014**, *4*, 52–61, doi:10.1080/22311866.2014.890069.

78. Couladis, M.; Tzakou, O.; Verykokidou, E.; Harvala, C. Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity. *Phyther. Res.* **2003**, *17*, 194–195, doi:10.1002/PTR.1261.
79. Delazar, A.; Sabzevari, A.; Mojarrab, M.; Nazemiyeh, H.; Esnaashari, S.; Nahar, L.; Razavi, S.M.; Sarker, S.D. Free-radical-scavenging principles from *Phlomis caucasica*. *J. Nat. Med.* **2008**, *62*, 464–466, doi:10.1007/S11418-008-0255-Y.
80. Kyriakopoulou, I.; Magiatis, P.; Skaltsounis, A.L.; Aligiannis, N.; Harvala, C. Samioside, a new phenylethanoid glycoside with free-radical scavenging and antimicrobial activities from *Phlomis samia*. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1095–1097, doi:10.1021/np010128+.
81. Furman, D.; Campisi, J.; Verdin, E.; Carrera-Bastos, P.; Targ, S.; Franceschi, C.; Ferrucci, L.; Gilroy, D.W.; Fasano, A.; Miller, G.W.; et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 1822–1832, doi:10.1038/S41591-019-0675-0.
82. Azab, A.; Nassar, A.; Azab, A.N. Anti-Inflammatory activity of natural products. *Molecules* **2016**, *21*, doi:10.3390/MOLECULES21101321.
83. Lee, S.A.; Moon, S.-M.; Han, S.H.; Hwang, E.J.; Hong, J.H.; Park, B.-R.; Choi, M.S.; Ahn, H.; Kim, J.-S.; Kim, H.-J.; et al. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory effects of aqueous extract of *Anthriscus sylvestris* leaves. *J. Med. Food* **2018**, *21*, 585–595, doi:10.1089/jmf.2017.4089.
84. Kim, S.B.; Lee, A.Y.; Chun, J.M.; Lee, A.R.; Kim, H.S.; Seo, Y.S.; Moon, B.C.; Kwon, B.I. *Anthriscus sylvestris* root extract reduces allergic lung inflammation by regulating interferon regulatory factor 4-mediated Th2 cell activation. *J. Ethnopharmacol.* **2019**, *232*, 165–175, doi:10.1016/J.JEP.2018.12.016.
85. Spiegler, V.; Gierlikowska, B.; Saenger, T.; Addotey, J.N.; Sendker, J.; Jose, J.; Kiss, A.K.; Hensel, A. Root extracts from *Ononis spinosa* inhibit IL-8 release via interactions with toll-like receptor 4 and lipopolysaccharide. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 1, doi:10.3389/FPHAR.2020.00889/FULL.
86. Süntar, I.; Baldemir, A.; Coşkun, M.; Keleş, H.; Akkol, E.K. Wound healing acceleration effect of endemic *Ononis* species growing in Turkey. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *135*, 63–70, doi:10.1016/J.JEP.2011.02.023.
87. Shin, T.Y.; Lee, J.K. Effect of *Phlomis umbrosa* root on mast cell-dependent immediate-type allergic reactions by anal therapy. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **2003**, *25*, 73–85, doi:10.1081/IPH-120018285.
88. Shin, T.Y.; Kim, S.H.; Kim, D.K.; Leem, K.H.; Park, J.S. *Phlomis umbrosa* root inhibits mast cell-dependent allergic reactions and inflammatory cytokine secretion. *Phyther. Res.* **2008**, *22*, 153–158, doi:10.1002/ptr.2164.
89. Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. In *Proceedings of the Journal of Nutrition; American Institute of Nutrition*, **2000**; Vol. 130.

90. Pereira, D.M.; Valentão, P.; Pereira, J.A.; Andrade, P.B. Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules* **2009**, *14*, 2202–2211, doi:10.3390/molecules14062202.
91. Hollman, P.C.H. Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects? *J. Sci. Food Agric.* **2001**, *81*, 842–852, doi:10.1002/JSFA.900.
92. Stafford, H.A. Enzymic regulation of procyanidin biosynthesis; lack of a flav-3-en-3-ol intermediate. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 2643–2646, doi:10.1016/S0031-9422(00)97664-7.
93. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 727–747.
94. Harborne, J.B. Methods in plant biochemistry. In *Plant Phenolics*; Dey, P.M., Harborne, J.B., Ed.; Academic Press: London, **1989**.
95. Grosso, G.; Stepaniak, U.; Topor-Madry, R.; Szafraniec, K.; Pajak, A. Estimated dietary intake and major food sources of polyphenols in the Polish arm of the HAPIEE study. *Nutrition* **2014**, *30*, 1398–1403, doi:10.1016/j.nut.2014.04.012.
96. Cory, H.; Passarelli, S.; Szeto, J.; Tamez, M.; Mattei, J. The role of polyphenols in human health and food systems: A mini-review. *Front. Nutr.* **2018**, *5*, 1–9, doi:10.3389/fnut.2018.00087.
97. Zhang, P.Y. Polyphenols in health and disease. *Cell Biochem. Biophys.* **2015**, *73*, 649–664, doi:10.1007/S12013-015-0558-Z.
98. Singh, A.; Holvoet, S.; Mercenier, A. Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases. *Clin. Exp. Allergy* **2011**, *41*, 1346–1359, doi:10.1111/J.1365-2222.2011.03773.X.
99. Pérez-Jiménez, J.; Neveu, V.; Vos, F.; Scalbert, A. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2010**, *64 Suppl 3*, S112–S120, doi:10.1038/EJCN.2010.221.
100. Lecour, S.; T. Lamont, K. Natural polyphenols and cardioprotection. *Mini Rev. Med. Chem.* **2011**, *11*, 1191–1199, doi:10.2174/13895575111091191.
101. Rossi, L.; Mazzitelli, S.; Arciello, M.; Capo, C.R.; Rotilio, G. Benefits from dietary polyphenols for brain aging and Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* **2008**, *33*, 2390–2400, doi:10.1007/S11064-008-9696-7.
102. Khurana, S.; Venkataraman, K.; Hollingsworth, A.; Piche, M.; Tai, T.C. Polyphenols: Benefits to the Cardiovascular System in Health and in Aging. *Nutrients* **2013**, *5*, 3779, doi:10.3390/NU5103779.
103. Khan, H.; Ullah, H.; Aschner, M.; Cheang, W.S.; Akkol, E.K. Neuroprotective effects of quercetin in Alzheimer's disease. *Biomolecules* **2020**, *10*, doi:10.3390/BIOM10010059.
104. Zhang, H.; Tsao, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr. Opin. Food Sci.* **2016**, *8*, 33–42, doi:10.1016/J.COFS.2016.02.002.

105. Wang, S.; Moustaid-Moussa, N.; Chen, L.; Mo, H.; Shastri, A.; Su, R.; Bapat, P.; Kwun, I.S.; Shen, C.L. Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *J. Nutr. Biochem.* **2014**, *25*, 1–18, doi:10.1016/J.JNUTBIO.2013.09.001.
106. Briguglio, G.; Costa, C.; Pollicino, M.; Giambò, F.; Catania, S.; Fenga, C. Polyphenols in cancer prevention: New insights (Review). *Int. J. Funct. Nutr.* **2020**, *1*, 1–1, doi:10.3892/IJFN.2020.9.
107. Ivanov, M.; Kostić, M.; Stojković, D.; Soković, M. Rosmarinic acid–Modes of antimicrobial and antibiofilm activities of common plant polyphenol. *South African J. Bot.* **2022**, *146*, 521–527, doi:10.1016/J.SAJB.2021.11.050.
108. Ivanov, M.; Kannan, A.; Stojković, D.S.; Glamočlija, J.; Calhelha, R.C.; Ferreira, I.C.F.R.; Sanglard, D.; Soković, M. Flavones, flavonols, and glycosylated derivatives – impact on candida albicans growth and virulence, expression of cdr1 and erg11, cytotoxicity. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 1–12, doi:10.3390/ph14010027.
109. Babu, P.V.A.; Liu, D. Flavonoids and cardiovascular health. *Complement. Altern. Ther. Aging Popul.* **2009**, 371–392, doi:10.1016/B978-0-12-374228-5.00018-4.
110. O'Reilly, J.D.; Sanders, T.A.B.; Wiseman, H. Flavonoids protect against oxidative damage to LDL *in vitro*: use in selection of a flavonoid rich diet and relevance to LDL oxidation resistance *ex vivo*? *Free Radic. Res.* **2000**, *33*, 419–426, doi:10.1080/10715760000300951.
111. Belwal, T.; Nabavi, S.F.; Nabavi, S.M.; Habtemariam, S. Dietary anthocyanins and insulin resistance: When food becomes a medicine. *Nutrients* **2017**, *9*, doi:10.3390/NU9101111.
112. Griffiths, D.W. The inhibition of digestive enzymes by polyphenolic compounds. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1986**, *199*, 509–516, doi:10.1007/978-1-4757-0022-0_29.
113. Milovanovic, M.; Picuric-Jovanovic, K.; Vucelic-Radovic, B.; Vrbaski, Z. Antioxidant effects of flavonoids of *Anthriscus sylvestris* in lard. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* **1996**, *73*, 773–776, doi:10.1007/BF02517954.
114. Dall'Acqua, S.; Giorgetti, M.; Cervellati, R.; Innocenti, G. Deoxypodophyllotoxin content and antioxidant activity of aerial parts of *Anthriscus sylvestris* Hoffm. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **2006**, *61*, 658–662, doi:10.1515/znc-2006-9-1008.
115. Svendsen, A.B. Isolation of luteolin-7-glycoside from the flowers of *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. *Pharm. Acta Helv.* **1959**, *34*, 29–32.
116. Fejes, S.; Blázovics, A.; Lugasi, A.; Lemberkovics, É.; Petri, G.; Kéry, Á. In vitro antioxidant activity of *Anthriscus cerefolium* L. (Hoffm.) extracts. *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *69*, 259–265, doi:10.1016/S0378-8741(99)00171-3.
117. Wollenweber, E.; Dörr, M.; Rivera, D.; Roitman, J.N. Externally accumulated flavonoids in three Mediterranean *Ononis* species. *Z. Naturforsch. C.* **2003**, *58*, 771–775, doi:10.1515/ZNC-2003-11-1202.

118. Ghribi, L.; Waffo-Téguo, P.; Cluzet, S.; Marchal, A.; Marques, J.; Mérillon, J.M.; Ben Jannet, H. Isolation and structure elucidation of bioactive compounds from the roots of the Tunisian *Ononis angustissima* L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 3825–3830, doi:10.1016/J.BMCL.2015.07.076.
119. Gampe, N.; Darcsi, A.; Lohner, S.; Béni, S.; Kursinszki, L. Characterization and identification of isoflavonoid glycosides in the root of Spiny restharrow (*Ononis spinosa* L.) by HPLC-QTOF-MS, HPLC-MS/MS and NMR. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *123*, 74–81, doi:10.1016/J.JPBA.2016.01.058.
120. Addotey, J.N.; Lengers, I.; Jose, J.; Gampe, N.; Béni, S.; Petereit, F.; Hensel, A. Isoflavonoids with inhibiting effects on human hyaluronidase-1 and norneolignan clitorienolactone B from *Ononis spinosa* L. root extract. *Fitoterapia* **2018**, *130*, 169–174, doi:10.1016/J.FITOTE.2018.08.013.
121. Abdel-Kader, M.S. Preliminary pharmacological study of the pterocarpan macckian and trifolirhizin isolated from the roots of *Ononis vaginalis*. *Pak. J. Pharm. Sci.* **2010**, *23*, 182–187.
122. Barrero, A.F.; Cabrera, E.; Rodriguez Garcia, I. Pterocarpan from *Ononis viscosa* subsp. *breviflora*. *Phytochemistry* **1998**, *48*, 87–190.
123. El-Negoumy, S.I.; Abdalla, M.F.; Saleh, N.A.M. Flavonoids of *Phlomis aurea* and *P. floccosa*. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 772–774, doi:10.1016/0031-9422(86)88052-9.
124. Marin, P.D.; Veitch, N.C.; Grayer, R.J.; Kite, G.C.; Soković, M.; Janačković, P. Flavonoids from *Phlomis fruticosa* (Lamiaceae) growing in Montenegro. *Biochem. Syst. Ecol.* **2007**, *35*, 462–466, doi:10.1016/j.bse.2007.01.001.
125. Tomás-Barberan, F.A.; Gil, M.I.; Ferreres, F.; Tomás-Lorente, F. Flavonoid p-coumaroylglucosides and 8-hydroxyflavone allosylglucosides in some Labiatae. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3097–3102, doi:10.1016/0031-9422(92)83452-5.
126. Aghakhani, F.; Kharazian, N.; Lori Gooini, Z. Flavonoid constituents of *Phlomis* (Lamiaceae) species using liquid chromatography mass spectrometry. *Phytochem. Anal.* **2018**, *29*, 180–195, doi:10.1002/PCA.2733.
127. Marin, P.D.; Grayer, R.J.; Grujic-Jovanovic, S.; Kite, G.C.; Veitch, N.C. Glycosides of tricetin methyl ethers as chemosystematic markers in *Stachys* subgenus *Betonica*. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 1247–1253, doi:10.1016/J.PHYTOCHEM.2004.04.014.
128. Saracoglu, I.; Varel, M.; Hada, J.; Hada, N.; Takeda, T.; Donmez, A.A.; Calis, I. Phenylethanoid glycosides from *Phlomis integrifolia* Hub.-Mor. *Z. Naturforsch. C.* **2003**, *58*, 820–825, doi:10.1515/ZNC-2003-11-1213.
129. Kabouche, A.; Kabouche, Z.; Seguin, E.; Tillequin, F.; Bruneau, C. A phenylethanoid glycoside and flavonoids from *Phlomis crinita* (Cav.) (Lamiaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* **2005**, *8*, 813–816, doi:10.1016/J.BSE.2005.01.006.
130. CLSI, M07-A10 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Tenth Edition. **2015**.

131. Tsukatani, T.; Suenaga, H.; Shiga, M.; Noguchi, K.; Ishiyama, M.; Ezoe, T.; Matsumoto, K. Comparison of the WST-8 colorimetric method and the CLSI broth microdilution method for susceptibility testing against drug-resistant bacteria. *J. Microbiol. Methods* **2012**, *90*, 160–166, doi:10.1016/j.mimet.2012.05.001.
132. Živković, J.; Stojković, D.; Petrović, J.; Zdunić, G.; Glamočlija, J.; Soković, M. *Rosa canina* L.-new possibilities for an old medicinal herb. *Food Funct.* **2015**, *6*, 3687–3692, doi:10.1039/c5fo00820d.
133. Silva, L.N.; Da Hora, G.C.A.; Soares, T.A.; Bojer, M.S.; Ingmer, H.; Macedo, A.J.; Trentin, D.S. Myricetin protects *Galleria mellonella* against *Staphylococcus aureus* infection and inhibits multiple virulence factors. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, doi:10.1038/s41598-017-02712-1.
134. Soković, M.; Van Griensven, L.J.L.D. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Eur. J. Plant Pathol.* **2006**, *116*, 211–224, doi:10.1007/s10658-006-9053-0.
135. Popović, V.; Stojković, D.; Nikolić, M.; Heyerick, A.; Petrović, S.; Soković, M.; Niketić, M. Extracts of three *Laserpitium* L. species and their principal components laserpitine and sesquiterpene lactones inhibit microbial growth and biofilm formation by oral *Candida* isolates. *Food Funct.* **2015**, *6*, 1205–1211, doi:10.1039/c5fo00066a.
136. Uysal, S.; Zengin, G.; Locatelli, M.; Bahadori, M.B.; Mocan, A.; Bellagamba, G.; Luca, E. De; Mollica, A.; Aktumsek, A. Cytotoxic and enzyme inhibitory potential of two potentilla species (*P. speciosa* L. and *P. reptans* Willd.) and their chemical composition. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, doi:10.3389/fphar.2017.00290.
137. Feoktistova, M.; Geserick, P.; Leverkus, M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2016**, *2016*, 343–346, doi:10.1101/PDB.PROT087379.
138. Zengin, G.; Cvetanović, A.; Gašić, U.; Dragičević, M.; Stupar, A.; Uysal, A.; Šenkardes, I.; Sinan, K.I.; Picot-Allain, M.C.N.; Ak, G.; et al. UHPLC-LTQ OrbiTrap MS analysis and biological properties of *Origanum vulgare* subsp. *viridulum* obtained by different extraction methods. *Ind. Crops Prod.* **2020**, *154*, 112747, doi:10.1016/j.indcrop.2020.112747.
139. Barros, L.; Dueñas, M.; Pinela, J.; Carvalho, A.M.; Buelga, C.S.; Ferreira, I.C.F.R. Characterization and quantification of phenolic compounds in four tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) farmers' varieties in northeastern Portugal homegardens. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2012**, *67*, 229–234, doi:10.1007/S11130-012-0307-Z.
140. Bessada, S.M.F.; Barreira, J.C.M.; Barros, L.; Ferreira, I.C.F.R.; Oliveira, M.B.P.P. Phenolic profile and antioxidant activity of *Coleostephus myconis* (L.) Rchb.f.: An underexploited and highly disseminated species. *Ind. Crops Prod.* **2016**, *89*, 45–51, doi:10.1016/j.indcrop.2016.04.065.
141. Hay, S.I.; Rao, P.C.; Dolecek, C.; Day, N.P.J.; Stergachis, A.; Lopez, A.D.; Murray,

- C.J.L. Measuring and mapping the global burden of antimicrobial resistance. *BMC Med.* **2018**, *16*, 1–3, doi:10.1186/S12916-018-1073-Z/TABLES/1.
142. Høiby, N.; Bjarnsholt, T.; Givskov, M.; Molin, S.; Ciofu, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2010**, *35*, 322–332, doi:10.1016/J.IJANTIMICAG.2009.12.011.
 143. Xue, L.; Chen, Y.Y.; Yan, Z.; Lu, W.; Wan, D.; Zhu, H. Staphyloxanthin: a potential target for antivirulence therapy. *Infect. Drug Resist.* **2019**, *12*, 2151–2160, doi:10.2147/IDR.S193649.
 144. Donlan, R.M.; Costerton, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **2002**, *15*, 167–193, doi:10.1128/CMR.15.2.167-193.2002.
 145. Smiljković, M.; Kostić, M.; Stojković, D.; Glamočlija, J.; Soković, M. Could flavonoids compete with synthetic azoles in diminishing *Candida albicans* infections? A comparative review based on *in vitro* studies. *Curr. Med. Chem.* **2018**, *26*, 2536–2554, doi:10.2174/0929867325666180629133218.
 146. Chauhan, N.; Calderone, R. Two-component signal transduction proteins as potential drug targets in medically important fungi. *Infect. Immun.* **2008**, *76*, 4795–4803, doi:10.1128/IAI.00834-08.
 147. Nicola, A.M.; Albuquerque, P.; Paes, H.C.; Fernandes, L.; Costa, F.F.; Kioshima, E.S.; Abadio, A.K.R.; Bocca, A.L.; Felipe, M.S. Antifungal drugs: New insights in research & development. *Pharmacol. Ther.* **2019**, *195*, 21–38, doi:10.1016/J.PHARMTHERA.2018.10.008.
 148. Tariq, S.; Wani, S.; Rasool, W.; Shafi, K.; Bhat, M.A.; Prabhakar, A.; Shalla, A.H.; Rather, M.A. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microb. Pathog.* **2019**, *134*, doi:10.1016/J.MICPATH.2019.103580.
 149. Ferrante, C.; Recinella, L.; Ronci, M.; Orlando, G.; Di Simone, S.; Brunetti, L.; Chiavaroli, A.; Leone, S.; Politi, M.; Tirillini, B.; et al. Protective effects induced by alcoholic *Phlomis fruticosa* and *Phlomis herba-venti* extracts in isolated rat colon: Focus on antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial activities *in vitro*. *Phyther. Res.* **2019**, *33*, 2387–2400, doi:10.1002/ptr.6429.
 150. Sarikurkcu, C.; Uren, M.C.; Tepe, B.; Cengiz, M.; Kocak, M.S. *Phlomis armeniaca*: Phenolic compounds, enzyme inhibitory and antioxidant activities. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *78*, 95–101, doi:10.1016/j.indcrop.2015.10.016.
 151. Sarikurkcu, C.; Uren, M.C.; Tepe, B.; Cengiz, M.; Kocak, M.S. Phenolic content, enzyme inhibitory and antioxidative activity potentials of *Phlomis nissolii* and *P. pungens* var. *pungens*. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *62*, 333–340, doi:10.1016/j.indcrop.2014.09.002.
 152. Bulck, M. Van; Sierra-Magro, A.; Alarcon-Gil, J.; Perez-Castillo, A.; Morales-Garcia, J.A. Novel approaches for the treatment of alzheimer's and parkinson's disease. *Int.*

153. Moss, D.E. Improving anti-neurodegenerative benefits of acetylcholinesterase inhibitors in alzheimer's disease: Are irreversible inhibitors the future? *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*.
154. Li, Q.; Yang, H.; Chen, Y.; Sun, H. Recent progress in the identification of selective butyrylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *132*, 294–309.
155. Bonesi, M.; Loizzo, M.R.; Acquaviva, R.; Malfa, G.A.; Aiello, F.; Tundis, R. Anti-inflammatory and antioxidant agents from *Salvia* Genus (Lamiaceae): An assessment of the current state of knowledge. *Antiinflamm. Antiallergy. Agents Med. Chem.* **2017**, *16*, doi:10.2174/1871523016666170502121419.
156. Glovaci, D.; Fan, W.; Wong, N.D. Epidemiology of diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Curr. Cardiol. Rep.* **2019**, *21*, doi:10.1007/S11886-019-1107-Y.
157. Khursheed, R.; Singh, S.K.; Wadhwa, S.; Kapoor, B.; Gulati, M.; Kumar, R.; Ramanunny, A.K.; Awasthi, A.; Dua, K. Treatment strategies against diabetes: Success so far and challenges ahead. *Eur. J. Pharmacol.* **2019**, *862*.
158. Bullard, K.M.; Cowie, C.C.; Lessem, S.E.; Saydah, S.H.; Menke, A.; Geiss, L.S.; Orchard, T.J.; Rolka, D.B.; Imperatore, G. Prevalence of diagnosed diabetes in adults by diabetes type – United States, 2016. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2018**, *67*, 359–361.
159. Rakočević, I. Epidemija dijabetesa: uzroci i posledice, WHO report, **2020**.
160. Zengin, G.; Paksoy, M.Y.; Aumeeruddy, M.Z.; Glamocilja, J.; Sokovic, M.; Diuzheva, A.; Jekő, J.; Cziáky, Z.; Rodrigues, M.J.; Custodio, L.; et al. New insights into the chemical profiling, cytotoxicity and bioactivity of four *Bunium* species. *Food Res. Int.* **2019**, *123*, 414–424, doi:10.1016/j.foodres.2019.05.013.
161. Arnold, E.; Benz, T.; Zapp, C.; Wink, M. Inhibition of cytosolic phospholipase A2 α (cPLA2 α) by medicinal plants in relation to their phenolic content. *Molecules* **2015**, *20*, 15033–15048, doi:10.3390/MOLECULES200815033.
162. Karadağ, A.E.; Demirci, B.; Kültür, Ş.; Demirci, F.; Başer, K.H.C. Antimicrobial, anticholinesterase evaluation and chemical characterization of essential oil *Phlomis kurdica* Rech. fil. growing in Turkey. *J. Essent. Oil Res.* **2020**, *32*, 242–246, doi:10.1080/10412905.2020.1743786.
163. Sarkhail, P.; Salimi, M.; Sarkheil, P.; Heidarneshad, F.; Saeidnia, S. Evaluation of anti-melanogenic and cytotoxic activities of *Phlomis caucasica* on human melanoma SKMEL-3 cells. *Int. J. Cancer Manag.* **2017**, *10*, doi:10.5812/ijcm.4633.
164. Sarikurkcu, C.; Uren, M.C.; Kocak, M.S.; Cengiz, M.; Tepe, B. Chemical composition, antioxidant, and enzyme inhibitory activities of the essential oils of three *Phlomis* species as well as their fatty acid compositions. *Food Sci. Biotechnol.* **2016**, *25*, 687–693, doi:10.1007/s10068-016-0120-9.
165. Dagenais, G.R.; Leong, D.P.; Rangarajan, S.; Lanas, F.; Lopez-Jaramillo, P.; Gupta, R.;

- Diaz, R.; Avezum, A.; Oliveira, G.B.F.; Wielgosz, A.; et al. Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged adults in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. *Lancet* **2020**, *395*, 785–794, doi:10.1016/S0140-6736(19)32007-0.
166. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424, doi:10.3322/caac.21492.
 167. Jansone Assessor, R.B.; Jansone, B. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). **2014**.
 168. Fischer, E.G. Nuclear morphology and the biology of cancer cells. *Acta Cytol.* **2020**, *64*, 511–519, doi:10.1159/000508780.
 169. Evan, G.I.; Vousden, K.H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* **2001**, *411*, 342–348, doi:10.1038/35077213.
 170. Feitelson, M.A.; Arzumanyan, A.; Kulathinal, R.J.; Blain, S.W.; Holcombe, R.F.; Mahajna, J.; Marino, M.; Martinez-Chantar, M.L.; Nawroth, R.; Sanchez-Garcia, I.; et al. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Semin. Cancer Biol.* **2015**, *35 Suppl*, S25–S54, doi:10.1016/J.SEMCANCER.2015.02.006.
 171. Pascale, M.; Aversa, C.; Barbazza, R.; Marongiu, B.; Siracusano, S.; Stoffel, F.; Sulfaro, S.; Roggero, E.; Bonin, S.; Stanta, G. The proliferation marker Ki67, but not neuroendocrine expression, is an independent factor in the prediction of prognosis of primary prostate cancer patients. *Radiol. Oncol.* **2016**, *50*, 313–320, doi:10.1515/raon-2016-0033.
 172. Pilkington, S.M.; Bulfone-Paus, S.; Griffiths, C.E.M.; Watson, R.E.B. Inflammaging and the Skin. *J. Invest. Dermatol.* **2021**, *141*, 1087–1095, doi:10.1016/J.JID.2020.11.006.
 173. Rose-John, S.; Winthrop, K.; Calabrese, L. The role of IL-6 in host defence against infections: immunobiology and clinical implications. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2017**, *13*, 399–409, doi:10.1038/nrrheum.2017.83.
 174. Mudter, J.; Neurath, M.F. Il-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance. *Inflamm. Bowel Dis.* **2007**, *13*, 1016–1023, doi:10.1002/IBD.20148.
 175. Hirano, T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. *Int. Immunol.* **2021**, *33*, 127–148, doi:10.1093/INTIMM/DXAA078.
 176. Bruch-Gerharz, D.; Fehsel, K.; Suschek, C.; Michel, G.; Ruzicka, T.; Kolb-Bachofen, V. A proinflammatory activity of interleukin 8 in human skin: expression of the inducible nitric oxide synthase in psoriatic lesions and cultured keratinocytes. *J. Exp. Med.* **1996**, *184*, 2007, doi:10.1084/JEM.184.5.2007.
 177. Hendrawati, O.; Woerdenbag, H.J.; Michiels, P.J.A.; Aantjes, H.G.; Van Dam, A.; Kayser, O. Identification of lignans and related compounds in *Anthriscus sylvestris* by LC-ESI-MS/MS and LC-SPE-NMR. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 2172–2179,

doi:10.1016/j.phytochem.2011.08.009.

178. Sekhara, I.; Benaissa, O.; Amrani, A.; Giangiacomo, B.; Benabderrahmane, W.; Chaouch, M.A.; Zama, D.; Benayache, S.; Benayache, F. Antioxidant activity and chemical constituents of *Anthriscus vulgaris* Bernh. (Apiaceae) from Algeria. *Acta Sci. Nat.* **2020**, *7*, 59–70, doi:10.2478/asn-2020-0007.
179. Zhang, Y.; Shi, P.; Qu, H.; Cheng, Y. Characterization of phenolic compounds in *Erigeron breviscapus* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 2971–2984, doi:10.1002/rcm.3166.
180. Kurihara, T.; Kikuchi, M. Studies on the constituents of *Anthriscus sylvestris* Hoffm. II. On the components of the flowers and leaves. *Yakugaku Zasshi* **1979**, *99*, 602–606, doi:10.1248/yakushi1947.99.6_602.
181. Soliman, F.M.; Shehata, A.H.; Khaleel, A.E.; Ezzat, S.M. An acylated kaempferol glycoside from flowers of *Foeniculum vulgare* and *F. dulce*. *Molecules* **2002**, *7*, 245–251, doi:10.3390/70200245.
182. Manivannan, R.; Shopna, R. Isolation of quercetin and isorhamnetin derivatives and evaluation of anti-microbial and anti-inflammatory activities of *Persicaria glabra*. *Nat. Prod. Sci.* **2015**, *21*, 170–175.
183. Simeoni, M.C.; Pellegrini, M.; Sergi, M.; Pittia, P.; Ricci, A.; Compagnone, D. Analysis of polyphenols in the Lamiaceae family by Matrix Solid-Phase Dispersion Extraction followed by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry determination. *ACS Omega* **2018**, *3*, 17610–17616, doi:10.1021/ACSOMEGA.8B02239/SUPPL_FILE/AO8B02239_SI_001.PDF.
184. Jathlan Al-Rehaily, A.; Shamim Ahmad, M.; Yousaf, M.; Iqrar Khan, S.; Mustafa, J.; Lal Tekwani, B.; Jacob, M.; Abdulaziz Al-Yahya, M.; Sulaiman Al-Said, M.; Zhao, J.; et al. Bioactive chemical constituents of *Ononis natrix*. *J.Chem.Soc.Pak* **2014**, *36*, 1114.
185. Jaffal, S.M.; Abbas, M.A. Antinociceptive action of *Ononis spinosa* leaf extract in mouse pain models. *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* **2019**, *76*, 299–304, doi:10.32383/appdr/99291.
186. Zhang, Y.; Wang, Z. zhi Phenolic composition and antioxidant activities of two *Phlomis* species: A correlation study. *Comptes Rendus - Biol.* **2009**, *332*, 816–826, doi:10.1016/j.crv.2009.05.006.
187. Jabeen, B.; Riaz, N.; Saleem, M.; Naveed, M.A.; Ashraf, M.; Alam, U.; Rafiq, H.M.; Tareen, R.B.; Jabbar, A. Isolation of natural compounds from *Phlomis stewartii* showing α -glucosidase inhibitory activity. *Phytochemistry* **2013**, *96*, 443–448, doi:10.1016/j.phytochem.2013.09.015.
188. Gella, E.V.; Vavilova, N.K. On the investigation of polyphenolic compounds of *Phlomis tuberosa* L. *Rastit. Resur.* **1972**.
189. Karakas, F.P.; Turker, A.U. Improvement of shoot proliferation and comparison of secondary metabolites in shoot and callus cultures of *Phlomis armeniaca* by LC-ESI-

MS/MS analysis. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* **2016**, *52*, 608–618, doi:10.1007/s11627-016-9792-3.

190. Alakolanga, A.G.A.W.; Siriwardene, A.M.D.A.; Savitri Kumar, N.; Jayasinghe, L.; Jaiswal, R.; Kuhnert, N. LC-MSn identification and characterization of the phenolic compounds from the fruits of *Flacourtia indica* (Burm. F.) Merr. and *Flacourtia inermis* Roxb. *Food Res. Int.* **2014**, *62*, 388–396, doi:10.1016/j.foodres.2014.03.036.
191. Ersoz, T.; Saracoglu, İ.; Harput, Ü.Ş.; Çalis, İ. Iridoid and Phenylpropanoid Glycosides from *Phlomis grandiflora* var. *fimbrilligera* and *Phlomis fruticosa*. *Turkish J. Chem.* **2002**, *26*, 171–177.
192. Liu, P.; Deng, R.X.; Duan, H.Q.; Yin, W.P.; Zhao, T.Z. Phenylethanoid glycosides from the roots of *Phlomis umbrosa*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2009**, *11*, 69–74, doi:10.1080/10286020802435687.
193. Kirmizibekmez, H.; Piacente, S.; Pizza, C.; Dönmez, A.A.; Çalış, I. Iridoid and phenylethanoid glycosides from *Phlomis nissolii* and *P. capitata*. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. B J. Chem. Sci.* **2004**, *59*, 609–613, doi:10.1515/ZNB-2004-0523.
194. Kirmizibekmez, H.; Montoro, P.; Piacente, S.; Pizza, C.; Dönmez, A.; Çalış, I. Identification by HPLC-PAD-MS and quantification by HPLC-PAD of phenylethanoid glycosides of five *Phlomis* species. *Phytochem. Anal.* **2005**, *16*, 1–6, doi:10.1002/pca.802.
195. Ergene Öz, B.; Saltan İşcan, G.; Küpeli Akkol, E.; Süntar, İ.; Bahadır Acıkara, Ö. Isoflavonoids as wound healing agents from *Ononidis Radix*. *J. Ethnopharmacol.* **2018**, *211*, 384–393, doi:10.1016/J.JEP.2017.09.029.
196. Pietta, P.; Calatroni, A.; Zio, C. High-performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from *Ononis spinosa* L. *J. Chromatogr. A* **1983**, *280*, 172–175, doi:10.1016/S0021-9673(00)91555-3.
197. Clifford, M.N.; Johnston, K.L.; Knight, S.; Kuhnert, N. Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2900–2911, doi:10.1021/jf026187q.
198. Ivanov, M.; Novovic, K.; Maleševic, M.; Dinic, M.; Stojkovic, D.; Jovčić, B.; Sokovic, M. Polyphenols as inhibitors of antibiotic resistant bacteria-Mechanisms underlying rutin interference with bacterial virulence. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 385, doi:10.3390/PH15030385.
199. Zeng, L.; Zhang, G.; Lin, S.; Gong, D. Inhibitory mechanism of apigenin on α -glucosidase and synergy analysis of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 6939–6949, doi:10.1021/ACS.JAFC.6B02314/ASSET/IMAGES/ACS.JAFC.6B02314.SOCIAL.JPEG_V03.
200. Katalinić, M.; Rusak, G.; Domaćinović Barović, J.; Šinko, G.; Jelić, D.; Antolović, R.; Kovarik, Z. Structural aspects of flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 186–192, doi:10.1016/J.EJMECH.2009.09.041.

201. Nasr Bouzaiene, N.; Chaabane, F.; Sassi, A.; Chekir-Ghedira, L.; Ghedira, K. Effect of apigenin-7-glucoside, genkwanin and naringenin on tyrosinase activity and melanin synthesis in B16F10 melanoma cells. *Life Sci.* **2016**, *144*, 80–85, doi:10.1016/J.LFS.2015.11.030.
202. Miadoková, E. Isoflavonoids – an overview of their biological activities and potential health benefits. *Interdiscip. Toxicol.* **2009**, *2*, 211, doi:10.2478/V10102-009-0021-3.
203. Skała, E.; Makowczyńska, J.; Wieczfinska, J.; Kowalczyk, T.; Sitarek, P. Caffeoylquinic acids with potential biological activity from plant *in vitro* cultures as alternative sources of valuable natural products. *Curr. Pharm. Des.* **2020**, *26*, 2817–2842, doi:10.2174/1381612826666200212115826.
204. Gao, L.; Tang, Z.; Li, T.; Wang, J. Combination of kaempferol and azithromycin attenuates *Staphylococcus aureus*-induced osteomyelitis via anti-biofilm effects and by inhibiting the phosphorylation of ERK1/2 and SAPK. *Pathog. Dis.* **2021**, *79*, doi:10.1093/FEMSPD/FTAB048.
205. Park, S.-H.; Sim, Y.-B.; Han, P.-L.; Lee, J.-K.; Suh, H.-W. Antidepressant-like effect of kaempferol and quercetin, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Exp. Neurobiol.* **2010**, *19*, 30–38, doi:10.5607/EN.2010.19.1.30.
206. Liao, W.; Chen, L.; Ma, X.; Jiao, R.; Li, X.; Wang, Y. Protective effects of kaempferol against reactive oxygen species-induced hemolysis and its antiproliferative activity on human cancer cells. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *114*, 24–32, doi:10.1016/J.EJMECH.2016.02.045.
207. Alkhalidy, H.; Moore, W.; Wang, A.; Luo, J.; McMillan, R.P.; Wang, Y.; Zhen, W.; Hulver, M.W.; Liu, D. Kaempferol ameliorates hyperglycemia through suppressing hepatic gluconeogenesis and enhancing hepatic insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *J. Nutr. Biochem.* **2018**, *58*, 90–101, doi:10.1016/J.JNUTBIO.2018.04.014.
208. Alkhalidy, H.; Moore, W.; Wang, Y.; Luo, J.; McMillan, R.P.; Zhen, W.; Zhou, K.; Liu, D. The flavonoid kaempferol ameliorates streptozotocin-induced diabetes by suppressing hepatic glucose production. *Molecules* **2018**, *23*, doi:10.3390/MOLECULES23092338.
209. Lei, X.; Guo, J.; Wang, Y.; Cui, J.; Feng, B.; Su, Y.; Zhao, H.; Yang, W.; Hu, Y. Inhibition of endometrial carcinoma by Kaempferol is interceded through apoptosis induction, G2/M phase cell cycle arrest, suppression of cell invasion and upregulation of m-TOR/PI3K signalling pathway. *J. BUON.* **2019**, *24*, 1555–1561.
210. Zhu, G.; Liu, X.; Li, H.; Yan, Y.; Hong, X.; Lin, Z. Kaempferol inhibits proliferation, migration, and invasion of liver cancer HepG2 cells by down-regulation of microRNA-21. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2018**, *32*, doi:10.1177/2058738418814341.
211. Yeon, M.J.; Lee, M.H.; Kim, D.H.; Yang, J.Y.; Woo, H.J.; Kwon, H.J.; Moon, C.; Kim, S.H.; Kim, J.B. Anti-inflammatory effects of kaempferol on *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2019**, *83*, 166–173, doi:10.1080/09168451.2018.1528140.

8 PRILOZI

BIOGRAFIJA

Dejan Stojković rođen je 1986. godine u Vranju. Diplomski rad pod naslovom: „Tradicionalna upotreba biljke *Sempervivum tectorum* L. u južnoj Srbiji, hemijski sastav i tretman bakterijskih infekcija uha“ odbranio je sa ocenom 10, 26.03.2018. godine na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu. Od 2019. godine zaposlen je na Odeljenju za fiziologiju biljaka, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, a volonterski je radio od 2005. godine i učestvovao je u realizaciji domaćih i međunarodnih projekata na istom institutu. Kao prvi autor/koautor publikovao je preko 90 naučnih radova u časopisima od međunarodnog i nacionalnog značaja, a koautor je i 5 poglavlja u kategoriji M11, pod afilijacijom IBISS-a. Učestvovao je na međunarodnim i domaćim konferencijama. Recenzent je u brojnim međunarodnim časopisima i član Editorial Board-a dva međunarodna časopisa. Član je u nekoliko domaćih i međunarodnih naučnih društava. Prethodnih godina aktivno je učestvovao u promociji nauke na Festivalu nauke i Noć istraživača. Radovi Dejana Stojkovića su prema bazi SCOPUS do sada citirani preko 1700 puta, a vrednost njegovog *h*- indeksa u istoj bazi podataka iznosi 22.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Дејан Стојковић _____

број индекса _____ Б3024/2018 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Биолошки потенцијал и хемијски профил метанолних екстраката биљака *Anthriscus cerefolium* (L.) Hoffm. (Apiaceae), *Ononis spinosa* L. (Fabaceae) и *Phlomis fruticosa* L.(Lamiaceae)“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 29.03.2022.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада

Име и презиме аутора _____ Дејан Стојковић _____

Број индекса _____ Б3024/2018 _____

Студијски програм _____ Биологија _____

Наслов рада „Биолошки потенцијал и хемијски профил метанолних екстраката биљака *Anthriscus cerefolium* (L.) Hoffm. (Apiaceae), *Ononis spinosa* L. (Fabaceae) и *Phlomis fruticosa* L.(Lamiaceae)“

Ментор: _____ др Марина Соковић и др Немања Рајчевић _____

Потписани/а: _____ Дејан Стојковић _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис
докторанда**

У Београду, 29.03.2022.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Биолошки потенцијал и хемијски профил метанолних екстраката биљака *Anthriscus cerefolium* (L.) Hoffm. (Apiaceae), *Ononis spinosa* L. (Fabaceae) и *Phlomis fruticosa* L.(Lamiaceae)“ која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 29.03.2022.

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.