

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
UNIVERZITETA U BEOGRADU - FARMACEUTSKOG FAKULTETA**

KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU – DOKTORSKE STUDIJE

Na sednici Nastavno-naučnog veća Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta, održanoj 20.09.2018. god., imenovana je Komisija u sastavu:

1. Prof. dr Silvana Petrović, redovni profesor, mentor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet
2. Dr sc. Milica Drobac, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet
3. Dr sc. Marina Soković, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“
4. Dr sc. Tatjana Stanojković, viši naučni saradnik, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Beograd
5. Dr sc. Marjan Niketić, naučni i muzejski savetnik, Prirodnjački muzej, Beograd

za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije pod nazivom „**Hemijska i farmakološka karakterizacija odabranih taksona roda *Heracleum* L. (Apiaceae), autohtonih za jugoistočnu Evropu**“, kandidata dipl. farm. Ljuboša J. Ušjaka, istraživača-saradnika na realizaciji projekta br. 173021 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Članovi Komisije su pregledali priloženu disertaciju i podnose Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta sledeći

I Z V E Š T A J

1. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija dipl. farm. Ljuboša J. Ušjaka pod nazivom „**Hemijska i farmakološka karakterizacija odabranih taksona roda *Heracleum* L. (Apiaceae), autohtonih za jugoistočnu Evropu**“, sastoji se od sledećih poglavlja: Sažetak na srpskom i engleskom jeziku, Uvod, Cilj, Materijal i metode, Rezultati i diskusija, Zaključci, Literatura i Prilog.

Doktorska disertacija je napisana na 259 strana i sadrži 43 slike (11 u Uvodu i 32 u Rezultatima i diskusiji), 26 tabela (3 u Uvodu, 5 u Materijalu i metodama i 18 u Rezultatima i diskusiji) i 276 literaturnih navoda. Prilog doktorske disertacije je napisan na 19 strana i sadrži 19 slika.

U **Uvodu** su date informacije o rodu *Heracleum* L., tj. opšti botanički opis, rasprostranjenje u flori Evrope i podela na sekcije. Zatim su dati botanički opisi i rasprostranjenje devet taksona ispitivanih u okviru doktorske disertacije: *H. sphondylium* L., *H. sibiricum* L., *H. montanum* Schleich. ex Gaudin, *H. ternatum* Velen., *H. pyrenaicum* subsp. *pollinianum* (Bertol.) F. Pedrotti & Pignatti, *H. pyrenaicum* subsp. *orsinii* (Guss.) F. Pedrotti & Pignatti i *H. verticillatum* Pančić iz grupe *H. sphondylium*, i *H. orphanidis* Boiss., svi iz *H. sect. Heracleum*, kao i *H. austriacum* subsp. *siifolium* (Scop.) Nyman iz *H. sect. Wendia* (Hoffm.) DC. Dat je pregled do sada ispitivanih etarskih ulja izolovanih iz različitih biljnih organa/delova predstavnika ovog roda, prinosi ovih etarskih ulja i njihove dominantne komponente. Sledi prikaz struktura kumarina i biljnih organa/delova taksona roda *Heracleum* u kojima su ovi sekundarni metaboliti identifikovani. Od kumarina u biljkama ovog roda najčešći su furanokumarini (prvenstveno supstituisani metoksi i/ili

prenil grupama) i u okviru ove doktorske disertacije diskutovana je i njihova fototoksičnost, ali i značaj u savremenoj medicini. Navedeni su i ostali sekundarni metaboliti (poliacetileni, fitosteroli, lignani, iridoidi, flavonoidi, fenilpropani, fenoli, fenolkarboksilne kiseline i dr.), a takođe i primarni metaboliti (masne kiseline i fosfolipidi) identifikovani u različitim organima/delovima biljaka ovog roda. Sledi poglavlje koje se odnosi na primenu prvenstveno mečje šape, *H. sphondylium*, velike mečje šape, *H. sibiricum* i ostalih ispitivanih, ali i drugih taksona roda *Heracleum* u narodnoj medicini i ishrani. Na kraju uvoda je dat detaljan pregled do sada ispitivanih farmakoloških efekata etarskih ulja i ekstrakata biljaka ovog roda.

Cilj doktorske disertacije je jasno definisan i predstavlja hemijsku i farmakološku karakterizaciju devet taksona roda *Heracleum* autohtonih za jugoistočnu Evropu. Hemijska karakterizacija obuhvata kvalitativnu i kvantitativnu analizu sastava etarskih ulja izolovanih iz različitih delova/organa ispitivanih biljaka, furanokumarina dihlormetanskih ekstrakata podzemnih organa i plodova, i masnih kiselina, sterola i triterpena masnih ulja plodova. Jedan od ciljeva je i utvrđivanje hemosistematskog značaja identifikovanih komponenti etarskih ulja i furanokumarina. Farmakološka karakterizacija obuhvata ispitivanje antimikrobne, citotoksične i/ili antiradikalske aktivnosti odabranih izolovanih etarskih ulja.

U poglavlju **Materijal i metode** dati su lokaliteti i datumi sakupljanja biljnog materijala, i definisani su sakupljeni biljni organi/delovi, hemijski analizirani izolati i ispitivana farmakološka aktivnost. Navedeni su aparatura i instrumentalne metode korišćene za hemijsku analizu etarskih ulja, masnih ulja, sterola i triterpena: GC-FID i GC-MS, i furanokumarina: LC-MS, jednodimenzionalna (¹H) i dvodimenzionalna (ROESY) NMR spektroskopija, kao i spektrofotometrijske metode za ispitivanje citotoksične i antiradikalske aktivnosti. Opisana je metoda izolovanja etarskih ulja destilacijom vodenom parom u aparaturi po *Clevenger*-u, prikazani su prinosi etarskih ulja, dati su eksperimentalni uslovi i objašnjene metode kvalitativne i kvantitativne GC-FID i GC-MS analize etarskih ulja. U slučaju podzemnih organa i plodova, opisani su i uslovi *headspace* ekstrakcije najisparljivijih sastojaka. Opisan je način izrade dihlormetanskih ekstrakata iz podzemnih organa i plodova i dati su prinosi ekstrakata (u slučaju plodova i udeli kristalnih taloga i uljastih supernatanata). Prikazani su eksperimentalni uslovi i objašnjene metode kvalitativne i kvantitativne LC-MS analize furanokumarina dihlormetanskih ekstrakata. Dati su jednačine kalibracionih kriva, koeficijenti korelacije, linerani opsezi, kao i limiti detekcije i kvantifikacije utvrđeni za tri standarda furanokumarina GC-FID i GC-MS analizom, i za pet standarda furanokumarina LC-MS analizom. Opisane su multivarijantne statističke metode (PCA - analiza glavnih komponenti, nMDS - nemetrično multidimenzionalno skaliranje i UPGMA - metoda klaster analize) primenjene u cilju utvrđivanja hemosistematskog značaja komponenti etarskih ulja i furanokumarina. Opisane su metode saponifikacije uljastih supernatanata dihlormetanskih ekstrakata plodova, esterifikacije masnih kiselina i silanizacije sterola i triterpena uljastih supernatanata, i dati eksperimentalni uslovi i opisane metode kvalitativne i kvantitativne GC-FID i GC-MS analize navedenih metabolita.

Opisan je postupak mikrodilucione metode korišćene za ispitivanje antimikrobne aktivnosti odabranih etarskih ulja na četiri vrste Gram-pozitivnih bakterija: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus flavus* i *Bacillus cereus*, četiri vrste Gram-negativnih bakterija: *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae* i *Escherichia coli*, i osam vrsta patogenih mikromiceta (plesni): *Aspergillus fumigatus*, *A. versicolor*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *Trichoderma viride*, *Penicillium funiculosum*, *P. ochrochloron* i *P. verrucosum* var. *cyclopium*. Dobijeni rezultati upoređivani su sa referentnim antibioticima (streptomycinom i ampicilinom) i antimikoticima (bifonazolom i ketokonazolom). Opisan je postupak kolorimetrijskog MTT testa korišćenog za utvrđivanje citotoksične aktivnosti odabranih etarskih ulja na humanim tumorskim ćelijskim linijama: HeLa (ćelijska linija karcinoma grlića materice), LS174 (ćelijska linija karcinoma debelog creva) i A549 (ćelijska linija nesitnoćelijskog karcinoma pluća), kao i selektivnosti ovog efekta na humano normalnoj ćelijskoj liniji MRC-5 (ćelijska linija fetalnih fibroblasta pluća). Dobijeni rezultati poređeni su sa cisplatinom. Opisan je postupak kolorimetrijskog DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) testa korišćenog za ispitivanje antiradikalske

aktivnosti odabranih etarskih ulja, kao i TLC-DPPH (*dot-blot*) testa korišćenog za preliminarnu procenu doprinosa pojedinih komponenti odabranih etarskih ulja pokazanom anti-DPPH efektu.

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije prikazani su i diskutovani u poglavlju **Rezultati i diskusija** na 135 stranica teksta, kroz 18 tabela i 32 slike. Ovo poglavlje dopunjeno je Prilogom sa 19 slika. Kandidat je svoje rezultate detaljno uporedio sa odgovarajućim rezultatima drugih autora.

U poglavlju **Zaključci** navedeni su najznačajniji zaključci koji su doneti na osnovu rezultata eksperimentalnog rada, kao i njihovog poređenja sa odgovarajućim relevantnim literaturnim podacima.

U poglavlju **Literatura** dat je spisak literaturnih navoda (276) citiranih harvardskim stilom.

2. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

U okviru ove doktorske disertacije ispitivano je devet taksona roda *Heracleum* poreklom iz jugoistočne Evrope: sedam iz grupe *H. sphondylium* (*H. sphondylium*, *H. sibiricum*, *H. montanum*, *H. ternatum*, *H. pyrenaicum* subsp. *pollinianum*, *H. pyrenaicum* subsp. *orsinii* i *H. verticillatum*), i *H. orphanidis*, svi iz *H. sect. Heracleum*, kao i *H. austriacum* subsp. *siifolium* iz *H. sect. Wendia*. Biljni materijal prikupljan je u Srbiji, Crnoj Gori, Makedoniji i Sloveniji.

Ukupno 59 etarskih ulja devet ispitivanih taksona, i to 16 ulja podzemnih organa, 18 ulja plodova, 16 ulja listova, osam ulja cvasti, kao i ulje nadzemnih delova u cvetu *H. austriacum* subsp. *siifolium*, izolovano je destilacijom vodenom parom i analizirano gasnom hromatografijom sa FID i MS detekcijom.

Dominantne komponente etarskih ulja podzemnih organa predstavnika grupe *H. sphondylium* bili su monoterpeni (23,2-89,2%). U slučaju ulja *H. sphondylium* i *H. montanum* najzastupljeniji je bio (*Z*)- β -ocimen (28,9 i 22,4%). Ulja podzemnih organa ostalih taksona ove grupe bila su bogata β -pinenom (16,0-47,3%), koji je bio ujedno i njihova dominantna komponenta, sa izuzetkom ulja jednog od četiri ispitivana uzorka podzemnih organa *H. sibiricum* u kome je limonen (22,7%) bio najzastupljeniji. Dodatno, ulja podzemnih organa preostala tri ispitivana uzorka *H. sibiricum* bila su bogata i fenilpropanima (26,2-48,3%), pre svega metileugenolom (21,8-26,9%) i elemicinom (4,4-25,6%). Dominantna komponenta ulja podzemnih organa *H. orphanidis* (koji pripada sekciji *Heracleum*, ali ne i grupi *H. sphondylium*) i *H. austriacum* subsp. *siifolium* (iz sekcije *Wendia*) bio je (*Z*)-falkarinol (80,0 i 72,3%). Hemijski sastav *headspace* frakcija (tj. frakcija najisparljivijih komponenti) podzemnih organa ispitivanih taksona grupe *H. sphondylium* bio je u skladu sa sastavom njihovih etarskih ulja, jer su najzastupljenije komponente ulja bile ujedno i najisparljivije. U *headspace* frakcijama takođe su dominirali monoterpeni (84,5-100,0%), (*Z*)- β -ocimen u slučaju *H. montanum* (65,4%), a β -pinen u slučaju ostalih predstavnika ove grupe (44,0-79,7%). Nasuprot tome, u *headspace* frakciji podzemnih organa *H. orphanidis* najzastupljeniji je bio *n*-nonan (89,8%), s obzirom da je glavni sastojak njihovog etarskog ulja (*Z*)-falkarinol slabije isparljiv.

Dominantni sastojci etarskih ulja plodova bili su alifatični estri (72,7-96,2%): u slučaju taksona iz sekcije *Heracleum* oktilacetat (17,7-84,5%), a u slučaju *H. austriacum* subsp. *siifolium* iz sekcije *Wendia* oktilheksanoat (49,8%). *Headspace* frakcije plodova takođe su bile bogate alifatičnim estrima (47,0-86,7%), u slučaju taksona sekcije *Heracleum* prvenstveno oktilacetatom (14,0-85,9%), a u slučaju *H. austriacum* subsp. *siifolium* oktil-2-metilbutanoatom (22,8%), praćenog alifatičnim alkoholom *n*-oktanolom (48,5%).

U etarskim uljima listova i cvasti predstavnika grupe *H. sphondylium*, kao i nadzemnih delova u cvetu *H. austriacum* subsp. *siifolium* dominantni su bili različiti seskviterpeni, fenilpropani ili monoterpeni. U etarskom ulju listova *H. sphondylium* dominirao je germakren D (11,0%), u uljima tri ispitivana uzorka *H. sibiricum* metileugenol (18,4-57,0%), a u uljima po jednog uzorka ove vrste elemicin (22,6%), (*Z*)-izoelemicin (16,6%), α -*trans*-bergamoten (33,7%), germakren D (14,6%) i β -bisabolen (31,5%), u ulju *H. montanum* (*E*)- β -farnezen (18,4%), u ulju jednog uzorka *H. ternatum* (*Z*)-izoelemicin (35,1%), a u ulju drugog uzorka ove vrste germakren D (20,7%), u uljima *H. pyrenaicum* subsp. *pollinianum* i *H. pyrenaicum* subsp. *orsinii* (*E*)-nerolidol (28,5 i 20,5%), i u

ulju *H. verticillatum* limonen (20,3%). U etarskom ulju cvasti *H. sphondylium* dominantan je bio apiol (16,8%), u ulju jednog uzorka *H. sibiricum* metileugenol (22,9%), a u ulju drugog uzorka ove vrste i *H. ternatum* (Z)-izoelemicin (25,4 i 22,4%), u ulju *H. montanum* (E)- β -farnezen (11,4%), u ulju *H. pyrenaicum* subsp. *pollinianum* (E)-nerolidol (30,2%), i u ulju *H. pyrenaicum* subsp. *orsinii* (E)-kariofilen (11,6%). Etarsko ulje nadzemnih delova u cvetu (herbe) *H. austriacum* subsp. *siifolium* takođe je bilo bogato (E)-kariofilenom (31,0%). Sa druge strane, ulja listova i cvasti *H. orphanidis* su se dominantno sastojala od alifatičnih estara (85,1 i 77,7%), prvenstveno oktilacetata (83,5 i 51,0%).

Multivarijantna statistička analiza (PCA, 2D nMDS i UPGMA) sastava etarskih ulja i analiziranih *headspace* frakcija pokazala je da su ispitivani taksoni roda *Heracleum* grupisani u skladu sa njihovom taksonomskom klasifikacijom, nezavisno od lokaliteta i datuma prikupljanja uzoraka. Navedena statistička analiza sastava ulja podzemnih organa, listova i cvasti, kao i *headspace* frakcija podzemnih organa pokazala je odvajanje *H. orphanidis* i *H. austriacum* subsp. *siifolium* od predstavnika grupe *H. sphondylium*, i grupisanje podvrsti *H. pyrenaicum* u okviru ove grupe. Statistička analiza sastava ulja i *headspace* frakcija plodova pokazala je jasno odvajanje *H. austriacum* subsp. *siifolium* iz sekcije *Wendia* od predstavnika sekcije *Heracleum*. Uvođenje treće dimenzije u nMDS analizu sastava ulja plodova dovelo je do potpunog razdvajanja svih vrsta, kao i izdvajanja predstavnika grupe *H. sphondylium*. PCA analiza je pokazala da je veći broj komponenti (a ne isključivo dominantne) doprineo razdvajanju vrsta.

S obzirom da je u pojedinim etarskim uljima ispitivanih taksona utvrđeno prisustvo potencijalno fototoksičnih furanokumarina, u skladu sa preporukama Evropske agencije za lekove, procenjen je bezbednosni profil ovih etarskih ulja u odnosu na utvrđeni sadržaj ukupnih furanokumarina računatih kao 8-metoksipsoralen (8-MOP). Ustanovljeni su dnevni unosi etarskih ulja koji ne doprinose značajno ukupnom riziku (1,94-5,23 mL za ulja podzemnih organa, 5,23-15,68 mL za ulja plodova i 2,90-15,68 mL za ulja listova ili cvasti), kao i dnevni unosi etarskih ulja koji ne predstavljaju nikakav rizik (0,02-0,05 mL za ulja podzemnih organa, 0,05-0,16 mL za ulja plodova i 0,03-0,16 mL za ulja listova ili cvasti).

U suvim dihlormetanskim ekstraktima podzemnih organa, kao i kristalnim talozima dihlormetanskih ekstrakata plodova svih devet taksona identifikovano je ukupno 12 furanokumarina. Ksantotoksin, izopimpinelin, bergapten, izobergapten i imperatorin su identifikovani LC-MS metodom korišćenjem standardnih supstanci. Struktura navedenih furanokumarina je potvrđena, a dodatno biakangelicin, heraklenol, sfondin, heraklenin, pimpinelin, biakangelikol i felopterin su identifikovani na osnovu njihovih UV, MS, ¹H i/ili ROESY NMR spektara.

Suvi dihlormetanski ekstrakti podzemnih organa predstavnika sekcije *Heracleum* imali su visok sadržaj ukupnih furanokumarina (408,01-601,55 mg/g), među kojima je bio dominantan pimpinelin (206,60-273,95 mg/g), a sledili su ga izopimpinelin (70,57-119,45 mg/g), sfondin (43,35-93,14 mg/g), bergapten (35,53-71,80 mg/g) i izobergapten (35,01-58,19 mg/g). Nasuprot tome, suvi dihlormetanski ekstrakt podzemnih organa *H. austriacum* subsp. *siifolium* iz sekcije *Wendia*, imao je značajno nižu količinu ukupnih furanokumarina (15,38 mg/g), a dominantan je bio ksantotoksin (6,36 mg/g).

Kristalni talozi dihlormetanskih ekstrakata plodova ispitivanih taksona sekcije *Heracleum* imali su takođe visok sadržaj ukupnih furanokumarina (od 193,69 do 369,32 mg/g). U slučaju *H. verticillatum* najzastupljeniji je bio imperatorin (169,56 mg/g), u slučaju *H. orphanidis* bergapten (84,93 mg/g), a u slučaju ostalih šest biakangelikol (51,83-104,26 mg/g), bergapten (70,34-97,86 mg/g) i heraklenin (25,47-87,33 mg/g). Nasuprot predstavnicima sekcije *Heracleum*, kristalni talog dihlormetanskog ekstrakta plodova *H. austriacum* subsp. *siifolium* imao je značajno nižu količinu ukupnih furanokumarina (44,31 mg/g), a dominantan je bio imperatorin (19,68 mg/g).

Multivarijantna statistička analiza (PCA, 2D nMDS i UPGMA) furanokumarina podzemnih organa pokazala je odvajanje *H. austriacum* subsp. *siifolium* iz sekcije *Wendia* od predstavnika sekcije *Heracleum*, a analiza furanokumarina plodova i dodatno odvajanje *H. orphanidis* od predstavnika grupe *H. sphondylium*, ali i izdvajanje *H. verticillatum* u okviru grupe *H. sphondylium*.

Uljasti supernatanti dihlormetanskih ekstrakata plodova analiziranih osam predstavnika sekcije *Heracleum* saponifikovani su u cilju analize sastava masnih kiselina. U nesaponifikovanoj frakciji analizirani su steroli i triterpeni. Analiza isparljivih metilovanih masnih kiselina i silanizovanih sterola i triterpena vršena je gasnom hromatografijom sa FID i MS detekcijom. U frakciji masnih kiselina dominantne su bile mononezasićene (57,8-70,3%), prvenstveno petroselinska (42,8-56,5%) i oleinska (12,3-13,7%), a sledila ih je po količini polinezasićena linolna kiselina (20,3-33,3%). Sadržaj dominantne petroselinske kiseline određen je i metodom eksternog standarda (298,8-433,4 mg/g uljastog supernatanta). Među sterolima i triterpenima najzastupljeniji su bili fitosteroli (87,2-92,5%), prvenstveno β -sitosterol (44,9-56,9%), a po količini su ga sledili stigmasterol (15,7-25,0%), Δ^7 -stigmastenol (6,6-12,5%) i kampesterol (5,2-8,1%). Jedini identifikovani triterpen α -amirin bio je zastupljen u značajno nižem procentu (0,8-6,0%).

Antimikrobna aktivnost 30 odabranih etarskih ulja, i to po osam ulja podzemnih organa, listova i plodova i šest ulja cvasti ispitivanih taksona testirana je mikrodilucionom metodom na po četiri Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, kao i na osam mikromiceta (plesni). Rezultati su izraženi kao koncentracije etarskih ulja koje inhibiraju vidljiv rast bakterija, tj. minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), i kao koncentracije koje izazivaju eradikaciju 99,5% mikroorganizama, tj. minimalne baktericidne/fungicidne koncentracije (MBK/MFK). Pojedina etarska ulja bila su aktivna u koncentraciji nižoj ili približnoj 0,10 mg/mL, što se smatra interesantnom aktivnošću za dalje istraživanje, a u nekim slučajevima ova aktivnost je bila uporediva sa testiranim antibioticima (streptomycinom i ampicilinom) i/ili antimikoticima (bifonazolom i ketokonazolom).

Najbolju antibakterijsku aktivnost pokazali su etarsko ulje podzemnih organa *H. orphanidis* prema svim testiranim bakterijama (izuzev *Listeria monocytogenes*) (MIK=0,02-0,15 mg/mL; MBK=0,04-0,30 mg/mL), kao i sva ulja *H. pyrenaicum* subsp. *pollinianum* na testirane Gram-pozitivne bakterije (izuzev *L. monocytogenes*) (MIK=0,02-0,15 mg/mL; MBK=0,04-0,30 mg/mL). Dodatno, za ulja podzemnih organa i plodova *H. pyrenaicum* subsp. *pollinianum* demonstriran je značajan efekat na Gram-negativne bakterije (osim na *Salmonella typhimurium*), a za ulja listova i cvasti ovog taksona na *Enterobacter cloacae* (MIK=0,15-0,45 mg/mL; MBK=0,30-0,60 mg/mL). Zanimljivu antibakterijsku aktivnost ispoljilo je i ulje cvasti *H. montanum* prema svim testiranim bakterijama (osim *L. monocytogenes* i *Pseudomonas aeruginosa*) (MIK=0,10-0,40 mg/mL; MBK=0,13-1,00 mg/mL), i ulje cvasti *H. sphondylium* na Gram-negativne bakterije (MIK=0,12-0,40 mg/mL; MBK=0,15-1,00 mg/mL).

Značajnu aktivnost prema svim testiranim mikromicetama pokazala su etarska ulja cvasti *H. pyrenaicum* subsp. *pollinianum* (MIK=0,03-0,08 mg/mL; MFK=0,08-0,20 mg/mL), podzemnih organa *H. verticillatum* (MIK=0,05-0,44 mg/mL; MFK=0,11-0,88 mg/mL) i plodova *H. sibiricum* (MIK=0,15-0,40 mg/mL; MFK=0,25-0,50 mg/mL), kao i ulja listova *H. orphanidis* (osim na *Aspergillus fumigatus*) (MIK=0,15-0,30 mg/mL; MFK=0,30-0,60 mg/mL) i plodova *H. pyrenaicum* subsp. *pollinianum* (osim na *Trichoderma viride* i *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium*) (MIK=0,30 mg/mL; MFK=0,60 mg/mL).

Citotoksična aktivnost 26 odabranih etarskih ulja, i to po osam ulja podzemnih organa i plodova, šest ulja listova i četiri ulja cvasti testirana je na humanim tumorskim ćelijskim linijama HeLa, LS174 i/ili A549. Selektivnost ovog efekta ispitivana je na humanoj normalnoj ćelijskoj liniji MRC-5. Rezultati su izraženi kao koncentracije ulja koje inhibiraju preživljavanje 50% ćelija (IC₅₀). Ulja podzemnih organa, listova i plodova *H. pyrenaicum* subsp. *orsinii* (IC₅₀=6,49-14,56 μ g/mL) i *H. ternatum* (IC₅₀=6,71-25,27 μ g/mL), podzemnih organa i plodova *H. verticillatum* (IC₅₀=5,93-14,08 μ g/mL), i podzemnih organa *H. sphondylium* (IC₅₀=5,72-24,31 μ g/mL) su prema svim testiranim ćelijskim linijama tumora zadovoljila kriterijum NCI za citotoksičnost (IC₅₀<30,00 μ g/mL). Ulja nisu ispoljila toksični efekat na normalne MRC-5 ćelije (u koncentraciji 200,00 μ g/mL), sa izuzetkom ulja lista *H. verticillatum* koje je na njih delovalo slabo citotoksično (IC₅₀=120,11 μ g/mL).

Antiradikalska aktivnost odabranih 14 etarskih ulja, i to pet ulja podzemnih organa i devet ulja plodova analizirana je DPPH testom. Rezultati su izraženi kao koncentracije ulja koje neutrališu

50% DPPH radikala (SC_{50}). Ulja su ispoljila slabu anti-DPPH aktivnost, što je bilo u skladu sa njihovim hemijskim sastavom. Najbolju aktivnost pokazala su ulja podzemnih organa i plodova *H. sibiricum*, podzemnih organa *H. pyrenaicum* subsp. *orsinii* i plodova *H. verticillatum* i *H. ternatum* ($SC_{50}=5,19-9,25 \mu\text{L/mL}$). Doprinos pojedinih komponenti ulja demonstriranim efektu preliminarno je procenjen TLC-DPPH (*dot-blot*) testom. U aktivnim anti-DPPH zonama ispitivanih ulja dominirali su oksidovani terpeni i fenilpropani.

3. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA KANDIDATA SA PODACIMA IZ LITERATURE

Rod *Heracleum* obuhvata oko 120 aromatičnih biljaka rasprostranjenih pretežno na severnoj hemisferi u uslovima umerene klime. Njegovi centri diverziteta su planine Kavkaz u jugozapadnoj Aziji i Hengduan u južnoj Kini (Bahadori i sar., 2016). U flori Evrope opisano je 18 autohtonih taksona ovog roda (Brummitt, 1968; Hartvig, 1986), koji su prema konceptu Mandenove (1951) raspoređeni u šest sekcija. Za jugoistočnu Evropu autohtono je 12 taksona ovog roda: osam iz grupe *H. sphondylium*, *H. orphanidis* i *H. carpathicum* Porc. iz sekcije *Heracleum*, kao i *H. austriacum* subsp. *siifolium* i *H. humile* Sm. iz sekcije *Wendia* (Logacheva i sar., 2008; Mandenova, 1951; Tonascia, 1992).

Različiti organi/delovi mečje šape, *H. sphondylium*, ali i ostalih biljaka iz grupe *H. sphondylium* primenjivali se u narodnoj medicini zemalja jugoistočne Evrope za lečenje poremećaja GIT-a (kao što su npr. gubitak apetita, hiperacidoza, nadutost, dispepsija, dijareja, katar creva), epilepsije, hipertenzije, respiratornih infekcija i zapaljenja, seksualne astenije (npr. usled nervoze ili umora), i spolja kod crnog prišta, zagnojenih rana i/ili uboda insekata (Lesinger, 2006; Tucakov, 1997). Austrijska mečja šapa, tj. tipska podvrsta vrste *H. austriacum* L. (*H. austriacum* subsp. *austriacum*) primenjivala se za lečenje epilepsije u centralnoj Evropi, u periodu renesanse (Adams i sar., 2012). U priručnicima za ishranu u prirodi navodi se da su koren, mlade stabljike i listovi biljaka iz grupe *H. sphondylium* jestivi (Vračarić, 1977).

Od sekundarnih metabolita, u biljkama roda *Heracleum* najčešće su ispitivani etarska ulja i furanokumarini (Bahadori i sar., 2016). Od literaturnih podataka koji se odnose na hemijski sastav do sada ispitivanih etarskih ulja, najveći broj odnosi se na etarska ulja izolovana iz plodova, gde su i zastupljena u najvećoj količini. U etarskim uljima plodova uglavnom su bili najzastupljeniji alifatični estri, ređe monoterpeni. Sastav etarskih ulja ostalih organa/delova taksona roda *Heracleum* bio je mnogo raznovrsniji. Naime, u etarskim uljima nadzemnih delova u cvetu ili plodovima, kao i u uljima listova, cvasti i podzemnih organa, među najzastupljenijim komponentama nalazili su se različiti monoterpeni, seskviterpeni, fenilpropani i alifatični estri (Bahadori i sar., 2016; Mojab i Nickavar, 2003; Tkachenko, 1994).

U okviru ove doktorske disertacije sva etarska ulja podzemnih organa ispitivanih taksona analizirana su po prvi put. Rezultati ispitivanja sastava etarskih ulja taksona iz grupe *H. sphondylium* dobijeni u okviru ove doktorske disertacije, bili su u skladu sa literaturnim podacima za ulja korena 13 vrsta ovog roda gajenih u Rusiji: monoterpeni, prvenstveno β -pinen, ocimen i/ili limonen, bili su značajno zastupljeni (Tkachenko, 2009). Poliacetilen (*Z*)-falkarinol bio je dominantan u ispitivanim etarskim uljima podzemnih organa *H. orphanidis* i *H. austriacum* subsp. *siifolium*, a takođe je prethodno identifikovan u hloroformskom ekstraktu korena *H. moellendorffii* Hance (Nakano i sar., 1998).

Od taksona koji su predmet ove doktorske disertacije, do sada je u određenoj meri ispitivan hemijski sastav etarskih ulja listova, cvasti i plodova *H. sphondylium* (Bicchi i sar., 1990; Falahati-Anbaran i sar., 2018; Pavela i sar., 2017), plodova *H. ternatum* (İşcan i sar., 2003; 2004; Maggi i sar., 2014; Pavela i sar., 2017), i nadzemnih delova *H. pyrenaicum* subsp. *pollinianum* (Evergetis i sar., 2009), *H. sibiricum* (Miladinović i sar., 2013) i *H. orphanidis* (Mileski i sar., 2016).

Prethodno je analiziran hemijski sastav etarskih ulja plodova *H. sphondylium* sakupljenih u blizini Trondhajma u Norveškoj (Falahati-Anbaran i sar., 2018) i Trefleza u Francuskoj (Pavela i sar., 2017), izolovanih destilacijom vodenom parom. Takođe, analiziran je i sastav etarskih ulja

izolovanih direktno, ekstrakcijom heksanom, iz odgovarajućih sekretornih kanala (kako iz *vittae commissuralis*, tako i iz *vittae intrajugalis*) plodova poreklom iz okoline Trenta u Italiji (Bicchi i sar., 1990). Oba etarska ulja izolovana destilacijom vodenom parom i etarsko ulje izolovano iz *vittae commissuralis* bila su kvalitativno slična ispitivanom ulju plodova *H. sphondylium* iz Slovenije, uz izvesne kvantitativne razlike. Glavna komponenta svih ovih etarskih ulja bio je oktilacetat (78,1% u ulju iz Norveške, 66,6% u ulju iz Francuske, 18,1-34,6% u ulju iz Italije iz *vittae commissuralis*, a 67,1% u ulju iz Slovenije). Etarsko ulje iz *vittae commissuralis* bilo je bogato i oktilheksanoatom (24,5-30,5%). Od etarskih ulja izolovanih destilacijom vodenom parom značajnija količina ovog jedinjenja bila je prisutna samo u ulju iz Slovenije (8,4%). Etarsko ulje izolovano iz *vittae commissuralis* sadržalo je značajnu količinu furanokumarina (npr. biakangelikol 8,1-8,7%), dok su ovi sastojci u etarskim uljima izolovanim destilacijom vodenom parom bili odsutni ili prisutni samo u tragovima (bergapten u ispitivanom ulju iz Slovenije), što je u skladu sa slabijom isparljivošću furanokumarina. Etarsko ulje izolovano iz *vittae intrajugalis* pretežno je sadržalo monoterpena, najviše limonen (5,8-36,8%). U etarskim uljima izolovanim destilacijom vodenom parom iz celih plodova monoterpeni su detektovani u znatno manjoj količini, npr. limonen je bio prisutan u sva tri ulja u količini $\leq 0,01\%$. To je očigledno posledica toga što je količina etarskog ulja lokalizovanog u *vittae commissuralis* mnogo veća u odnosu na onu lokalizovanu u *vittae intrajugalis* (*vittae commissuralis* su značajno krupnije u odnosu na *vittae intrajugalis*).

Prethodno je analizirano i etarsko ulje plodova *H. ternatum* sa po dva lokaliteta u Italiji (sa Sibilinskih planina i Umbrijsko-Markeških Apenina) i Turskoj (iz okoline Denizlija i Ankare) (İşcan i sar., 2003; 2004; Maggi i sar., 2014; Pavela i sar., 2017). U etarskim uljima iz Italije dominantan je bio oktilacetat (54,9-61,0%) (Maggi i sar., 2014; Pavela i sar., 2017). Malo manja količina ovog alifatičnog estera bila je prisutna u etarskim uljima plodova *H. ternatum* iz Crne Gore (49,0 i 42,0%), ispitivanim u okviru ove doktorske disertacije. Sa druge strane, oktilacetat nije bio dominantan u etarskim uljima plodova ove vrste iz okoline Ankare (31,6%) i Denizlija (svega 7,3%). U ovim etarskim uljima najzastupljeniji su bili oktilbutanoat (37,7%), odnosno *n*-oktanol (50,3%) (İşcan i sar., 2003; 2004). U etarskim uljima plodova *H. ternatum* ispitivanim u okviru ove doktorske disertacije, *n*-oktanol (9,6 i 7,6 %) i oktilbutanoat (2,4 i 2,5%) su takođe identifikovani, ali u znatno manjem procentu.

Kao što je to bio slučaj i u ovoj doktorskoj disertaciji, za neke od dominantnih alifatičnih estara prethodno analiziranih etarskih ulja plodova taksona roda *Heracleum* ustanovljen je hemosistematski značaj. Naime, etarska ulja plodova vrsta iz sekcije *Pubescentia* Manden. (*H. persicum* Desf., *H. gorganicum* Rech. f. i *H. rechingeri* Manden.) su sadržala podjednako visoke količine oktilacetata (11,0-44,2%) i heksilbutanoata (12,6-51,2%). Sa druge strane, u etarskim uljima vrsta iz sekcije *Wendia* (*H. rawianum* C.C. Towns., *H. pastinacifolium* K. Koch i *H. anisactis* Boiss. & Hohen.) i *Villosa* Manden. (*H. antasiaticum* Manden.) iz Irana utvrđene su manje količine heksilbutanoata (0,03-11,0%), a veće oktilacetata (48,7-93,5%) (Falahati-Anbaran i sar., 2018; Radjabian i sar., 2014). Međutim, *H. austriacum* subsp. *siifolium* jedini predstavnik sekcije *Wendia* ispitivan u okviru ove doktorske disertacije (poreklom iz jugoistočne Evrope, tj. iz Slovenije) je u etarskom ulju plodova sadržao značajno manje (2,9%) oktilacetata (dominantan je bio drugi estar *n*-oktanol, oktilheksanoat), dok heksilbutanoat nije bio ni detektovan.

Bicchi i sar. (1990) su prethodno ispitivali sastav etarskih ulja izolovanih direktno ekstrakcijom heksanom iz segmenata dobijenih isecanjem lisnih nerava drugog reda (u čijoj neposrednoj blizini se nalaze sekretorni kanali sa etarskim uljem), kao i iz celih kruničnih listića cvetova *H. sphondylium* poreklom iz okoline Trenta u Italiji. Etarsko ulje iz sekretornih kanala listova dobijeno ovom tehnikom sastojalo se od šest seskviterpena, četiri monoterpena i palmitinske kiseline, dok su u ulju kruničnih listića identifikovana samo dva seskviterpena i jedan monoterpen. Dominantna komponenta ovih etarskih ulja bio je (*E*)-kariofilen (28,0 i 19,5%), a sledio ga je α -bergamoten (14,3 i 4,4%) (Bicchi i sar., 1990). U okviru ove doktorske disertacije ispitivana su etarska ulja listova i cvasti *H. sphondylium* izolovana destilacijom vodenom parom, i u njima je identifikovano 82, odnosno 95 komponenti, uključujući i (*E*)-kariofilen i α -*trans*-bergamoten, ali samo u tragovima, ili u značajno manjoj količini (2,8-4,7%). Ovi rezultati potvrđuju činjenicu da

geografsko poreklo, tj. ekološki faktori, kao i metoda izolacije etarskog ulja značajno utiču na njegov sastav.

Do sada su ispitivana i etarska ulja nadzemnih delova *H. pyrenaicum* subsp. *pollinianum* (sakupljenih na planini Eta u Grčkoj, kao *H. sphondylium* subsp. *pyrenaicum* (Lam.) Bonnier & Layens), *H. orphanidis* (sakupljenih na planini Baba u Makedoniji) i *H. sibiricum* (sakupljenih na planini Vidlič u Srbiji) (Evergetis i sar., 2009; Miladinović i sar., 2013; Mileski i sar., 2016). Glavna komponenta etarskog ulja nadzemnih delova u cvetu *H. pyrenaicum* subsp. *pollinianum* bio je oktilacetat (17,4%) (Evergetis i sar., 2009). Oktilacetat je takođe bio značajno zastupljen u etarskom ulju cvasti ovog taksona, analiziranom u okviru ove doktorske disertacije (10,5%), dok je u ulju listova bio prisutan u maloj količini (0,5%). Dominantan u etarskom ulju nadzemnih delova u cvetu *H. orphanidis* bio je *n*-oktanol (39,6%), a sledili su ga oktilheksanoat (17,6%) i oktilacetat (14,1%) (Mileski i sar., 2016). U etarskim uljima listova i cvasti ove vrste, ispitivanim u okviru ove doktorske disertacije, dominantan je bio oktilacetat (83,5 i 51,0%), količina oktilheksanoata je bila značajna u ulju cvasti (23,6%), a mala u ulju lista (1,0%), a *n*-oktanol je detektovan u nešto manjim količinama u oba ulja (4,7% u ulju lista i 7,8% u ulju cvasti). Miladinović i sar. (2013) su analizirali hemijski sastav etarskih ulja nadzemnih delova *H. sibiricum*, ali biljni organi koji su činili ispitivane nadzemne delove nisu bili definisani. Ovo etarsko ulje je bilo slično ulju plodova *H. sibiricum* ispitivanom u okviru ove doktorske disertacije usled dominacije alifatičnih estara, ali sa značajnim razlikama u sadržaju pojedinih komponenti (dominantan je bio oktilbutanoat sa 36,8%).

U različitim biljnim organima/delovima taksona roda *Heracleum* identifikovani su jednostavni kumarini, kao i linearni i angularni furanokumarini i njihovi heterozidi, dimeri, trimeri, tetrameri i/ili estri sa različitim kiselinama (Bahadori i sar., 2016). Najčešći od njih, tj. linearni i angularni furanokumarini supstituisani metoksi i/ili prenil grupama prethodno su identifikovani i u taksonima ispitivanim u okviru ove doktorske disertacije, tj. u korenu i plodovima *H. sphondylium* i *H. sibiricum* (Bogucka-Kocka, 1999; Bogucka-Kocka i Krzaczek, 2003; Cieśla i sar., 2008; Erdelmeier i sar., 1985), kulturi ćelija kalusa osovine cvasti *H. sphondylium* (Tirillini i Ricci, 1998), kao i korenu i nadzemnim delovima *H. orphanidis* (Mileski i sar., 2016), dok su u nekim ispitivanim taksonima ova jedinjenja samo preliminarno identifikovana tankoslojnom hromatografijom (Ognyanov i sar., 1966; Weimarck i Nilsson, 1980). Rezultati dobijeni za furanokumarine korena i plodova *H. sphondylium* i *H. sibiricum* su u saglasnosti sa prethodno publikovanim literaturnim podacima (Bogucka-Kocka, 1999; Bogucka-Kocka i Krzaczek, 2003; Cieśla i sar., 2008; Erdelmeier i sar., 1985). Dodatno, u okviru ove doktorske disertacije, u podzemnim organima *H. sphondylium* identifikovani su heraklenin, biakangelikol, imperatorin i felopterin, u plodu *H. sphondylium* heraklenol, biakangelicin, sfondin, ksantotoksin, pimpinelin, izobergaptin i imperatorin, u podzemnim organima *H. sibiricum* heraklenol, ksantotoksin, izobergaptin i imperatorin, a u plodu *H. sibiricum* heraklenol, sfondin, pimpinelin i izobergaptin. Dobijeni rezultati takođe potvrđuju prisustvo prethodno tentativno (LC-MS metodom) identifikovanih sfondina, ksantotoksina, izopimpinolina, bergaptena, pimpinelina, izobergaptena, imperatorina i felopterina u korenu *H. orphanidis* (Mileski i sar., 2016), kao i preliminarno (tankoslojnom hromatografijom) identifikovanih furanokumarina *H. verticillatum* (sfondina, izopimpinolina, bergaptena, pimpinelina i izobergaptena u korenu, i izopimpinolina, bergaptena i pimpinelina u plodovima) i *H. montanum* (bergaptena u korenu, i ksantotoksina i bergaptena u plodovima) (Ognyanov i sar., 1966; Weimarck i Nilsson, 1980). Dodatno, u okviru ove doktorske disertacije identifikovana su još tri furanokumarina u korenu i šest u plodovima *H. verticillatum*, kao i pet u korenu i 10 u plodovima *H. montanum*.

Masne kiseline i steroli biljaka roda *Heracleum* su do sada sporadično ispitivani. Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije su u skladu sa prethodno dobijenim nalazima Kleiman-a i Spencer-a (1982). Naime, petroselinska (47,4-56,3%), linolna (24,6-31,7%) i oleinska (12,2-14,4%) kiselina su takođe bile dominantne u masnim uljima plodova nekoliko taksona roda *Heracleum*, uključujući *H. sphondylium* (iz Turske), *H. sibiricum* (iz Mađarske), *H. montanum* i *H. pyrenaicum* subsp. *orsinii* (oba taksona sakupljena na teritoriji bivše Jugoslavije) (Kleiman i

Spencer, 1982). Međutim, u uljastim supernatantima dihlormetanskih ekstrakata plodova ovih taksona u okviru ove doktorske disertacije identifikovano je dodatno još po 12 masnih kiselina. β -Sitosterol je prethodno izolovan iz petroletarskog ekstrakta plodova *H. sphondylium* (Lawrie i sar., 1968), i iz etanolnog ekstrakta nadzemnih delova *H. pyrenaicum* Lam. (Gonzalez i sar., 1978), kao i iz različitih ekstrakata različitih delova i organa nekih drugih vrsta roda *Heracleum* (Bahadori i sar., 2016). Sa druge strane, stigmasterol koji do sada nije detektovan u taksonima ispitivanim u okviru ove doktorske disertacije, izolovan je iz nekoliko drugih vrsta roda *Heracleum*, npr. iz petroletarskog ekstrakta nadzemnih delova *H. platytaenium* (Dincel i sar., 2013). Identifikacija ostalih sterola, kao i triterpena α -amirina (0,8-6,0%) izvršena je u taksonima roda *Heracleum* u okviru ove doktorske disertacije po prvi put.

Farmakološka aktivnost etarskih ulja biljaka roda *Heracleum* (uključujući antimikrobnu, citotoksičnu i anti-DPPH) intenzivno je ispitivana poslednjih 20 godina. Od taksona koji su predmet ove doktorske disertacije, antimikrobna aktivnost je do sada ispitivana za etarska ulja plodova *H. ternatum* (iz okoline Denzilija i Ankare, Turska, i sa Sibilinskih planina, Italija), kao i nadzemnih delova *H. sibiricum* (sa planine Vidlič, Srbija) i *H. orphanidis* (sa planine Baba, Makedonija) (Iščan i sar., 2003; 2004; Maggi i sar., 2014; Miladinović i sar., 2013; Mileski i sar., 2016). Među prethodno ispitivanim etarskim uljima plodova *H. ternatum*, najaktivnije je bilo ulje iz Denzilija, u kojem je dominirao *n*-oktanol (50,3%). Ovo ulje je inhibiralo rast *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* (MIK=0,125-1,00 mg/mL). Ustanovljena aktivnost je objašnjena prisustvom *n*-oktanola za koji su utvrđene iste MIK vrednosti kao i za etarsko ulje za navedene mikroorganizme (Iščan i sar., 2003). Sa druge strane, etarsko ulje plodova *H. ternatum* iz Italije, u kome je oktilacetat bio najzastupljeniji, nije bilo aktivno na *S. aureus*, *E. coli* i *P. aeruginosa* u koncentraciji 20,00 mg/mL, što su autori objasnili nižim sadržajem *n*-oktanola (4,0%) (Iščan i sar., 2004; Maggi i sar., 2014). Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije su u skladu sa prethodnim nalazima. Ispitivano etarsko ulje plodova *H. ternatum*, koje je sadržalo 9,6% *n*-oktanola, ispoljilo je antibakterijsku aktivnost (MIK=1,88-3,75 mg/mL), koja je bila slabija u odnosu na ulje iz Turske i bolja u odnosu na ulje iz Italije. Slično, značajna antibakterijska aktivnost demonstrirana je za etarsko ulje nadzemnih delova u cvetu *H. orphanidis*, u kome je takođe dominirao *n*-oktanol (39,6%), prema *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *Micrococcus flavus*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *Enterobacter cloacae* i *E. coli* (MIK=0,13-0,26 mg/mL) (Mileski i sar., 2016). Takođe, nešto slabija antibakterijska aktivnost prema *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes* i *P. aeruginosa* (MIK=2,43-9,72 mg/mL) pokazana je za etarsko ulje nadzemnih delova *H. sibiricum* (biljni organi nisu definisani), u kome su najzastupljeniji bili različiti alifatični estri i koje je sadržalo manje *n*-oktanola (13,6%) (Miladinović i sar., 2013).

Demonstrirana antimikrobna aktivnost etarskih ulja taksona roda *Heracleum* ispitivanih u okviru ove doktorske disertacije je u saglasnosti sa njihovim hemijskim sastavom. Prethodno je pokazano da je β -pinen, jedan od glavnih sastojaka etarskih ulja podzemnih organa *H. sibiricum*, *H. ternatum*, *H. pyrenaicum* subsp. *pollinianum*, *H. pyrenaicum* subsp. *orsinii* i *H. verticillatum* (detektovan u ukupno 28 ispitivanih ulja), inhibirao rast *M. flavus*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa* (MIK=0,005-0,01 mg/mL; MBK=0,0055-0,013 mg/mL). Na iste bakterije bio je aktivan i limonen, prisutan u 29 ispitivanih etarskih ulja, od toga u većoj količini u uljima podzemnih organa i listova *H. verticillatum* (MIK=0,007-0,01 mg/mL; MBK=0,007-0,015 mg/mL) (Soković i sar., 2010). (*Z*)-Falkarinol, identifikovan u 17 ispitivanih etarskih ulja, od toga dominantan u ulju podzemnih organa *H. orphanidis*, pokazao je značajnu aktivnost na *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *E. coli* (MIK=0,0031-0,00625 mg/mL) (Kobaisy i sar., 1997), a (*E*)-nerolidol, glavna komponenta etarskih ulja listova i cvasti *H. pyrenaicum* subsp. *pollinianum* (detektovana u ukupno 19 ulja), na *S. aureus* (MIK=0,0039 mg/mL) i *A. niger* (MIK=0,0156 mg/mL) (Tao i sar., 2013). Za ovaj seskviterpen prethodno je demonstrirano i da potencira efekat drugih antibiotika na *S. aureus* i *E. coli*, i stimuliše apsorpciju lekova kroz kožu (Brehm-Stecher i Johnson, 2003). Metileugenol, jedna od najzastupljenijih komponenti etarskih ulja listova i cvasti *H. sibiricum* i *H. ternatum*, kao i ulja podzemnih organa *H. sibiricum* (prisutan u

ukupno 18 ispitivanih ulja), bio je aktivan na bakterije *M. flavus* (MIK=0,36 mg/mL), *P. aeruginosa* (MIK=0,72 mg/mL), i plesni *Aspergillus niger* (MIK=0,20 mg/mL) i *A. fumigatus* (MIK=0,57 mg/mL) (Joshi, 2013), dok su (*E*)-kariofilen (MIK=0,125-0,25 mg/mL) i germakren D (MIK=0,0625-0,125 mg/mL), značajno zastupljeni u više etarskih ulja listova i cvasti (identifikovani u ukupno 19, odnosno 16 ispitivanih ulja), inhibirali rast *A. niger*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* i *P. aeruginosa* (Ben Hsouna i sar., 2013). Za oktilacetat, dominantan sastojak svih ispitivanih etarskih ulja plodova, kao i ulja listova i cvasti *H. orphanidis* (detektovan u ukupno 21 ispitivanom ulju), pokazana je antifungalna aktivnost na *A. ochraceus* (MIK=0,10 mg/mL) i *Penicillium funiculosum* (MIK=0,19 mg/mL) (Skalicka-Woźniak i sar., 2017). Dodatno, aktivnost na mikroorganizme ispitivane u okviru ove doktorske disertacije pokazana je i za mnoge komponente koje su u ispitivanim etarskim uljima bile zastupljene samo u manjoj količini, npr. za α -pinen, terpinolen, terpinen-4-ol, kariofilenoksid, α -humulen, eugenol i *n*-oktanol (Ben Hsouna i sar., 2013; İşcan i sar., 2003; Joshi, 2013; Kazemi i sar., 2012; Setzer i sar., 2006; Soković i sar., 2010; Tao i sar., 2013).

Za etarska ulja plodova *H. ternatum* iz Italije prethodno je pokazana citotoksična aktivnost na ćelijskim linijama adenokarcinoma dojke (MDA-MB 231), glioblastoma multiforme (T98G), malignog melanoma (A375) i karcinoma debelog creva (HCT116) (Maggi i sar., 2014). U okviru ove doktorske disertacije pokazano je citotoksično delovanje etarskih ulja iz različitih organa svih osam taksona roda *Heracleum* na HeLa, LS174 i/ili A549 ćelijskim linijama, koje se može barem delom objasniti prisustvom pojedinih dominantnih komponenti, ali i onih zastupljenih u manjoj količini. Za ove komponente je prethodno pokazana aktivnost na HeLa i/ili A549 ćelijskim linijama. Naime, proliferacija HeLa ćelija bila je inhibirana od strane (*Z*)-falkarinola (IC₅₀=8,58 µg/mL), detektovanog u 16 ispitivanih etarskih ulja, od toga dominantnog u ulju podzemnih organa *H. orphanidis*, elemicina (IC₅₀=2,00 µg/mL), identifikovanog u 20 ispitivanih ulja, od toga značajno zastupljenog u ulju listova *H. ternatum*, limonena (IC₅₀=22,10 µg/mL), prisutnog u 25 ispitivanih ulja, od toga u većoj količini u uljima podzemnih organa i listova *H. verticillatum*, i *n*-oktanela (IC₅₀=25,05 µg/mL), detektovanog u 20 ispitivanih ulja, od toga značajno zastupljenog u ulja plodova *H. ternatum*. Dodatno, β -pinen (IC₅₀=85,00 µg/mL), jedan od najzastupljenijih sastojaka etarskih ulja podzemnih organa *H. ternatum*, *H. verticillatum*, *H. pyrenaicum* subsp. *pollinianum* i *H. pyrenaicum* subsp. *orsinii* (ukupno identifikovan u 25 ispitivanih ulja), prethodno je bio citotoksičan na A549 ćelije, a (*E*)-nerolidol (IC₅₀=3,02-6,40 µg/mL), detektovan u 15 ispitivanih ulja, od toga dominantan u ulju listova *H. pyrenaicum* subsp. *orsinii*, i (*E*)-kariofilen (IC₅₀=19,8-21,3 µg/mL), prisutan u 15 ispitivanih ulja, od toga u većoj količini u uljima listova *H. verticillatum* i *H. pyrenaicum* subsp. *orsinii*, na obe (HeLa i A549) ćelijske linije. Dodatno, citotoksičnost prema HeLa i/ili A549 ćelijama pokazana je za komponente zastupljene samo u manjim količinama u ispitivanim etarskim uljima (npr. α -pinen, α -humulen, kariofilenoksid, terpinen-4-ol i β -jonon) (Bourgou i sar., 2010; Da Silva i sar., 2007; Herrmann i sar., 2013; Ikeda i sar., 1998; Jun i sar., 2011; Kubo i Morimitsu, 1995; Sobral i sar., 2014; Sylvestre i sar., 2007; Zapata i sar., 2014).

Sposobnost neutralizacije DPPH radikala prethodno je pokazana za pomenuto etarsko ulje plodova *H. ternatum* iz Italije (Maggi i sar., 2014) i etarsko ulje nadzemnih delova u cvetu *H. orphanidis* iz Makedonije (Mileski i sar., 2016), a u okviru ove doktorske disertacije za etarska ulja plodova *H. ternatum*, *H. sibiricum* i *H. verticillatum* i podzemnih organa *H. sibiricum*, *H. ternatum*, *H. pyrenaicum* subsp. *pollinianum*, *H. pyrenaicum* subsp. *orsinii* i *H. verticillatum*. Anti-DPPH aktivnost etarskog ulja plodova *H. ternatum* bila je slabija u odnosu literaturne podatke, i u skladu sa njegovim hemijskim sastavom (u analiziranom ulju dominirali su alifatični estri). Aktivnost etarskih ulja pokazana u okviru ove doktorske disertacije može se barem delom objasniti prisustvom komponenti za koje postoje literaturni podaci o sposobnosti neutralizacije DPPH radikala: eugenola (SC₅₀=0,01 µL/mL), spatulenola (SC₅₀=0,09 µL/mL), metileugenola (SC₅₀=0,10 µL/mL), terpinen-4-ola (1,48 µM/g troloks ekvivalenata) i elemicina (11,78 µM/g troloks ekvivalenata) (Adiani i sar., 2015; do Nascimento i sar., 2018; Park, 2006).

Literatura

1. Adams M, Schneider S-, Kluge M, Kessler M, Hamburger M. Epilepsy in the Renaissance: a survey of remedies from 16th and 17th century German herbals. *J Ethnopharmacol* 2012;143(1):1-13.
2. Adiani V, Gupta S, Chatterjee S, Variyar PS, Sharma A. Activity guided characterization of antioxidant components from essential oil of Nutmeg (*Myristica fragrans*). *J Food Sci Technol* 2015;52(1):221-230.
3. Bahadori MB, Dinparast L, Zengin G. The genus *Heracleum*: a comprehensive review on its phytochemistry, pharmacology, and ethnobotanical values as a useful herb. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2016;15(6):1018-1039.
4. Ben Hsouna A, Ben Halima N, Abdelkafi S, Hamdi N. Essential oil from *Artemisia phaeolepis*: chemical composition and antimicrobial activities. *J Oleo Sci* 2013;62(12):973-980.
5. Bicchi C, D'Amato A, Frattini C, Cappelletti EM, Caniato R, Filippini R. Chemical diversity of the contents from the secretory structures of *Heracleum sphondylium* subsp. *sphondylium*. *Phytochemistry* 1990;29(6):1883-1887.
6. Bogucka-Kocka A. The analysis of furanocoumarins in fruits of *Heracleum sibiricum* L. *Acta Pol Pharm Drug Res* 1999;56(5):399-402.
7. Bogucka-Kocka A, Krzaczek T. The furanocoumarins in the roots of *Heracleum sibiricum* L. *Acta Pol Pharm Drug Res* 2003;60(5):391-393.
8. Bourgou S, Pichette A, Marzouk B, Legault J. Bioactivities of black cummin essential oil and its main terpenes from Tunisia. *S Afr J Bot* 2010;76(2):210-216.
9. Brehm-Stecher BF, Johnson EA. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(10):3357-3360.
10. Brummitt RK. *Heracleum* L. U: Flora Europaea, Vol. 2. Uredili: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. Cambridge University Press, London, 1968, str. 364-366.
11. Cieřla L, Bogucka-Kocka A, Hajnos M, Petruczynik A, Waksmundzka-Hajnos M. Two-dimensional thin-layer chromatography with adsorbent gradient as a method of chromatographic fingerprinting of furanocoumarins for distinguishing selected varieties and forms of *Heracleum* spp. *J Chromatogr A* 2008;1207(1-2):160-168.
12. Da Silva SL, Figueiredo PM, Yano T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. leaves. *Acta Amazonica* 2007;37(2):281-286.
13. Dincel D, Hatipođlu SD, Goren AC, Topcu G. Anticholinesterase furocoumarins from *Heracleum platytaenium*, a species endemic to the Ida Mountains. *Turk J Chem* 2013;37(4):675-683.
14. do Nascimento KF, Moreira FMF, Alencar Santos J, Kassuya CAL, Croda JHR, Cardoso CAL, i sar. Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol. *J Ethnopharmacol* 2018;210:351-358.
15. Erdelmeier CAJ, Meier B, Sticher O. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of closely related furocoumarins. *J Chromatogr A* 1985;346(C):456-460.
16. Evergetis E, Michaelakis A, Kioulos E, Koliopoulos G, Haroutounian SA. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from six Apiaceae family taxa against the West Nile virus vector *Culex pipiens*. *Parasitol Res* 2009;105(1):117-124.
17. Falahati-Anbaran M, Mohammadi Bazargani M, Rohloff J. Large scale geographical mapping of essential oil volatiles in *Heracleum* (Apiaceae): identification of novel compounds and unraveling cryptic variation. *Chem Biodivers* 2018; doi: 10.1002/cbdv.201800230.
18. Gonzalez AG, Barroso JT, Lopez Dorta H, Luis JR, Rodriguez Luis F. Componentes de Umbelíferas: XX. Componentes del *Heracleum pyrenaicum* Lam. *An Quim* 1978;74:832-834.
19. Hartvig P. *Heracleum* L. U: Mountain Flora of Greece 1. Uredio: Strid A. Cambridge University Press, Cambridge, 1986, str. 723-725.
20. Herrmann F, Sporer F, Tahrani A, Wink M. Antitrypanosomal properties of *Panax ginseng* C. A. Meyer: new possibilities for a remarkable traditional drug. *Phytother Res* 2013;27(1):86-98.
21. Ikeda R, Nagao T, Okabe H, Nakano Y, Matsunaga H, Katano M, Mori M. Antiproliferative constituents in Umbelliferae plants. III. Constituents in the root and the ground part of *Anthriscus sylvestris* Hoffm. *Chem Pharm Bull* 1998;46(5):871-874.
22. İřcan G, Demirci F, Kürkçuođlu M, Kivanç M, Bařer KHC. The bioactive essential oil of *Heracleum sphondylium* L. subsp. *ternatum* (Velen.) Brummitt. *Z Naturforsch Sect C J Biosci* 2003;58(3-4):195-200.
23. İřcan G, Özek T, Özek G, Duran A, Bařer KHC. Essential oils of three species of *Heracleum*. Anticandidal activity. *Chem Nat Compd* 2004;40(6):544-547.
24. Joshi R. Chemical composition, *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of *Ocimum gratissimum*, *O. sanctum* and their major constituents. *Indian J Pharm Sci* 2013;75(4):457-462.
25. Jun NJ, Mosaddik A, Moon JY, Jang K-, Lee D-, Ahn KS, Cho SK. Cytotoxic activity of β -caryophyllene oxide isolated from Jeju Guava (*Psidium cattleianum* Sabine) leaf. *Rec Nat Prod* 2011;5(3):242-246.
26. Kazemi M, Rostami H, Ameri A. The study of compositions and antimicrobial properties of essential oil of *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* on human pathogens. *Curr Res Bacteriol* 2012;5:1-12.
27. Kleiman R, Spencer GF. Search for new industrial oils: XVI. Umbelliflorae – seed oils rich in petroselinic acid. *J Am Oil Chem Soc* 1982;59(1):29-38.

28. Kobaisy M, Abramowski Z, Lermer L, Saxena G, Hancock REW, Towers GHN, i sar. Antimycobacterial polyynes of Devil's club (*Oplonanax horridus*), a North American native medicinal plant. J Nat Prod 1997;60(11):1210-1213.
29. Kubo I, Morimitsu Y. Cytotoxicity of green tea flavor compounds against two solid tumor cells. J Agric Food Chem 1995;43(6):1626-1628.
30. Lawrie W, McLean J, El Garby Younes M. Constituents of the seeds of *Heracleum sphondylium*. Phytochemistry 1968;7(11):2065-2066.
31. Lesinger I. Kućna biljna ljekarna. Adamić, Rijeka, 2006.
32. Logacheva MD, Valiejo-Roman CM, Pimenov MG. ITS phylogeny of West Asian *Heracleum* species and related taxa of Umbelliferae-Tordylieae W.D.J.Koch, with notes on evolution of their psbA-trnH sequences. Plant Syst Evol 2008;270(3-4):139-157.
33. Maggi F, Quassinti L, Bramucci M, Lupidi G, Petrelli D, Vitali LA, i sar. Composition and biological activities of hogweed [*Heracleum sphondylium* L. subsp. *ternatum* (Velen.) Brummitt] essential oil and its main components octyl acetate and octyl butyrate. Nat Prod Res 2014;28(17):1354-1363.
34. Mandenova IP. *Heracleum* L. U: Flora of the U.S.S.R., Vol. 17. Uredio: Schischkin BK. Botanical Institute of the Academy of Sciences of the USSR, Moscow, Leningrad, 1951, str. 222-260.
35. Miladinović DL, Ilić BS, Mihajilov-Krstev TM, Nikolić DM, Cvetković OG, Marković MS, Miladinović LC. Antibacterial activity of the essential oil of *Heracleum sibiricum*. Nat Pro Commun 2013;8(9):1309-1311.
36. Mileski KS, Ćirić AD, Trifunović SS, Ristić MS, Soković MD, Matevski VS, i sar. *Heracleum orphanidis*: chemical characterisation, and comparative evaluation of antioxidant and antimicrobial activities with specific interest in the influence on *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Food Funct 2016;7(9):4061-4074.
37. Mojab F, Nickavar B. Composition of the essential oil of the root of *Heracleum persicum* from Iran. Iran J Pharm Res 2003;2:245-247.
38. Nakano Y, Matsunaga H, Saita T, Mori M, Katano M, Okabe H. Antiproliferative constituents in Umbelliferae plants II. Screening for polyacetylenes in some Umbelliferae plants, and isolation of panaxynol and falcariindiol from the root of *Heracleum moellendorffii*. Biol Pharm Bull 1998;21:257-261.
39. Ognyanov I, Gencheva G, Georgiev V, Panov P. Naturcumarine I. Cumarine in *Heracleum verticillatum* Panč. und *Heracleum sibiricum* L. Planta Med 1966;14:19-21.
40. Park H-. Toxicological studies on the essential oil of *Eugenia caryophyllata* buds. Nat Prod Sci 2006;12(2):94-100.
41. Pavela R, Maggi F, Cianfaglione K, Bruno M, Benelli G. Larvicidal activity of essential oils of five Apiaceae taxa and some of their main constituents against *Culex quinquefasciatus*. Chem Biodivers 2017;15:e1700382.
42. Radjabian T, Salimi A, Rahmani N. Essential-oil composition of the fruits of six *Heracleum* L. species from Iran: chemotaxonomic significance. Chem Biodivers 2014;11(12):1945-1953.
43. Setzer WN, Schmidt JM, Noletto JA, Vogler B. Leaf oil compositions and bioactivities of abaco bush medicines. Pharmacologyonline 2006;3:794-802.
44. Skalicka-Woźniak K, Grzegorzczak A, Świątek Ł, Walasek M, Widelski J, Rajtar B, i sar. Biological activity and safety profile of the essential oil from fruits of *Heracleum mantegazzianum* Sommier & Levier (Apiaceae). Food Chem Toxicol 2017;109:820-826.
45. Sobral MV, Xavier AL, Lima TC, de Sousa DP. Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. Sci World J 2014; doi: 10.1155/2014/953451.
46. Soković M, Glamočlija J, Marin PD, Brkić D, Van Griensven LJLD. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model. Molecules 2010;15(11):7532-7546.
47. Sylvestre M, Pichette A, Lavoie S, Longtin A, Legault J. Composition and cytotoxic activity of the leaf essential oil of *Comptonia peregrina* (L.) Coulter. Phytother Res 2007;21(6):536-540.
48. Tao R, Wang C-, Kong Z-. Antibacterial/antifungal activity and synergistic interactions between polyprenols and other lipids isolated from *Ginkgo biloba* L. leaves. Molecules 2013;18(2):2166-2182.
49. Tirillini B, Ricci A. Furocoumarin production by callus tissues of *Heracleum sphondylium* L. Phytother Res 1998;12(SUPPL. 1):S25-S26.
50. Tkachenko KG. Composition of the essential oils of *Heracleum stevenii* Manden. J Essent Oil Res 1994;6(5):535-537.
51. Tkachenko KG. Essential oils from roots of certain *Heracleum* species. Chem Nat Compd 2009;45(4):578-581.
52. Tonascia N. Biosystematische Untersuchungen an *Heracleum sphondylium* s.l. in der Schweiz. Ber Geobot Inst ETH 1992;58:101-120.
53. Tucakov J. Lečenje biljem. Rad, Beograd, 1997.
54. Vračarić B, Bakić J, Čolić D, Lintner V, Micković M, Rajšić R et al. Ishrana u prirodi. Vojnoizdavački zavod, Narodna knjiga, Beograd, 1977.
55. Weimarck G, Nilsson E. Phototoxicity in *Heracleum sphondylium*. Planta Med 1980;38(2):97-111.
56. Zapata B, Betancur-Galvis L, Duran C, Stashenko E. Cytotoxic activity of Asteraceae and Verbenaceae family essential oils. J Essent Oil Res 2014;26(1):50-57.

4. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Radovi publikovani u naučnim časopisima međunarodnog značaja (M20):

1. Ušjak Lj, Petrović S, Drobac M, Soković M, Stanojković T, Ćirić A, Grozdanić N, Niketić M. Chemical composition, antimicrobial and cytotoxic activity of *Heracleum verticillatum* Pančić and *H. ternatum* Velen. (Apiaceae) essential oils. *Chemistry and Biodiversity* 2016;13(4):466-476. (M22)
2. Ušjak Lj, Petrović S, Drobac M, Soković M, Stanojković T, Ćirić A, Niketić M. Chemical composition and bioactivity of the essential oils of *Heracleum pyrenaicum* subsp. *pollinianum* and *Heracleum orphanidis*. *Natural Product Communications* 2016;11(4):529-534. (M23)
3. Ušjak Lj, Petrović S, Drobac M, Soković M, Stanojković T, Ćirić A, Niketić M. Essential oils of three cow parsnips – composition and activity against nosocomial and foodborne pathogens and food contaminants. *Food and Function* 2017;8(1):278-290. (M21)
4. Ušjak Lj, Petrović S, Drobac M, Soković M, Stanojković T, Ćirić A, Niketić M. Edible wild plant *Heracleum pyrenaicum* subsp. *orsinii* as a potential new source of bioactive essential oils. *Journal of Food Science and Technology* 2017;54(8):2193-2202. (M22)
5. Ušjak Lj, Petrović S, Drobac M, Niketić M. Constituents of the essential oils of *Heracleum austriacum* subsp. *siifolium*, an endemic plant of the southeastern Alps. *Chemistry of Natural Compounds* 2018;54(2):384-386. (M23)
6. Ušjak Lj, Drobac M, Niketić M, Petrović S. Chemosystematic significance of essential oil constituents and furanocoumarins of underground parts and fruits of nine *Heracleum* L. taxa from Southeastern Europe. *Chemistry and Biodiversity* 2018; doi: 10.1002/cbdv.201800412 in press (M22)

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34):

1. Ušjak Lj, Petrović S, Drobac M, Soković M, Stanojković T, Glamočlija J, Tešević V, Niketić M. Chemical composition and bioactivity of the essential oils of *Heracleum ternatum* Velen., International Symposium: Natural Products and Drug Discovery - Future Perspectives, Vienna, Austria, November 13-14, 2014, Book of Abstracts, Poster P 63.
2. Ušjak Lj, Petrović S, Drobac M, Niketić M. DPPH scavenging activity of the fruit essential oils of six *Heracleum* L. taxa (Apiaceae), 2nd International Conference on Natural Products Utilization: from Plants to Pharmacy Shelf (ICNPU-2015), Plovdiv, Bulgaria, October 14-17, 2015, Book of Abstracts, p. 314.
3. Ušjak Lj, Petrović S, Drobac M, Soković M, Ćirić A, Niketić M. Chemical composition and antimicrobial activity of *Heracleum sibiricum* L. essential oils, 2nd International Conference on Natural Products Utilization: from Plants to Pharmacy Shelf (ICNPU-2015), Plovdiv, Bulgaria, October 14-17, 2015, Book of Abstracts p. 315.
4. Ušjak Lj, Petrović S, Drobac M, Soković M, Ćirić A, Niketić M. Chemical composition and antimicrobial activity of flower essential oils of three *Heracleum* L. taxa, 3rd International Conference on Natural Products Utilization: from Plants to Pharmacy Shelf (ICNPU-2017), Bansko, Bulgaria, October 18-21, 2017, Book of Abstracts p. 338.
5. Ušjak Lj, Petrović S, Drobac M, Niketić M. Chemosystematic significance of underground parts and fruit essential oil constituents of nine *Heracleum* taxa from Southeastern Europe, 10th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries (10th CMAPSEEC), Split, Croatia, May 20-24, 2018, Book of Abstracts p. 142.
6. Ušjak Lj, Drobac M, Niketić M, Petrović S. Chemosystematic evaluation of the composition of leaf and flower essential oils of eight *Heracleum* L. taxa from Southeastern Europe, 7th Balkan Botanical Congress (7BBC 2018), Novi Sad, Serbia, September 10-14, 2018, Botanica Serbica Vol. 42 (supplement 1) 7BBC Book of Abstracts pp. 130-131.

7. **Ušjak Lj**, Drobac M, Niketić M, Petrović S. DPPH radical scavenging potential of the root essential oils of five *Heracleum* L. taxa, 7th Balkan Botanical Congress (7BBC 2018), Novi Sad, Serbia, September 10-14, 2018, Botanica Serbica Vol. 42 (supplement 1) 7BBC Book of Abstracts p. 131.

Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64):

1. **Ušjak Lj**, Petrović S, Drobac M, Soković M, Stanojković T, Glamočlija J, Tešević V, Niketić M. Hemijski sastav i biološka aktivnost etarskih ulja *Heracleum pyrenaicum* Lam. subsp. *orsinii* (Guss.) F. Pedrotti & S. Pignatti (Apiaceae), Chemical composition and bioactivity of the essential oils of *Heracleum pyrenaicum* Lam. subsp. *orsinii* (Guss.) F. Pedrotti & S. Pignatti (Apiaceae), VI Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, Srbija, 15-19. oktobar 2014., Knjiga apstrakata pp. 324-325.
2. **Ušjak Lj**, Petrović S, Drobac M, Niketić M. Hemijski sastav etarskih ulja *Heracleum sibiricum* L. (Apiaceae), Chemical composition of the essential oils of *Heracleum sibiricum* L. (Apiaceae), VI Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, Srbija, 15-19. oktobar 2014., Knjiga apstrakata pp. 325-326.
3. **Ušjak Lj**, Petrović S. Procena bezbednosnog profila etarskih ulja taksona roda *Heracleum* L. (Apiaceae) u odnosu na utvrđeni sadržaj furanokumarina, Evaluation of safety profile of the essential oils of *Heracleum* L. taxa (Apiaceae) related to determined furanocoumarin content, VII Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, Srbija, 10-14. oktobar 2018., Arhiv za farmaciju (specijalni broj) 2018;68(2):344-345.
4. **Ušjak Lj**, Sofrenić I, Tešević V, Drobac M, Niketić M, Petrović S. Masne kiseline, steroli i triterpeni masnih ulja plodova osam taksona roda *Heracleum* L. iz jugoistočne Evrope, Fatty acids, sterols and triterpenes of the fruit fatty oils of eight *Heracleum* L. taxa from Southeastern Europe, VII Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, Srbija, 10-14. oktobar 2018., Arhiv za farmaciju (specijalni broj) 2018;68(3):700-701.

5. ZAKLJUČAK - OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

U okviru doktorske disertacije kandidata dipl. farm. Ljuboša J. Ušjaka izvršena je hemijska i farmakološka karakterizacija devet taksona roda *Heracleum* autohtonih za jugoistočnu Evropu.

Hemijska karakterizacija obuhvatila je kvalitativnu i kvantitativnu analizu etarskih ulja različitih biljnih organa/delova ispitivanih taksona (ukupno 59 uzoraka, i to 16 ulja podzemnih organa, 18 ulja plodova, 16 ulja listova, osam ulja cvasti i jedno ulje herbe). Sastav etarskih ulja podzemnih organa svih devet odabranih taksona, ulja plodova svih taksona izuzev *H. sphondylium* i *H. ternatum*, ulja cvasti i listova svih taksona izuzev *H. sphondylium*, kao i ulja nadzemnih delova u cvetu *H. austriacum* subsp. *siifolium* ispitivani su po prvi put. U slučaju taksona koji su prethodno u određenoj meri ispitivani, sastav etarskih ulja analiziranih u okviru ove doktorske disertacije bio je generalno u skladu sa prethodnim istraživanjima, ali su na osnovu dobijenih rezultata konstatovane i odgovarajuće specifičnosti u zavisnosti od metode izolovanja etarskog ulja.

S obzirom da je u pojedinim etarskim uljima utvrđeno prisustvo furanokumarina koji mogu delovati fototoksično, u okviru doktorske disertacije definisan je i bezbednosni profil ulja, tj. ustanovljen njihov maksimalni dozvoljeni dnevni unos u skladu sa odgovarajućim preporukama Evropske agencije za lekove, a u odnosu na utvrđeni sadržaj ovih sekundarnih metabolita.

Za podzemne organe svih osam taksona sekcije *Heracleum* (13 uzoraka) i plodove svih devet odabranih taksona (17 uzoraka), ispitivan je i sastav *headspace* frakcija po prvi put. Sastav *headspace* frakcija bio je u skladu sa sastavom etarskih ulja ovih biljnih organa, tj. sa isparljivošću njihovih komponenti.

U suvim dihlormetanskim ekstraktima podzemnih organa, kao i kristalnim talozima dihlormetanskih ekstrakata plodova svih devet taksona identifikovano je ukupno 12 furanokumarina (biakangelicin, heraklenol, sfondin, ksantotoksin, izopimpinelin, bergapten, heraklenin, biakangelikol, pimpinelin, izobergapten, imperatorin i felopterin). Furanokumarini podzemnih organa i plodova *H. pyrenaicum* subsp. *orsinii* i *H. austriacum* subsp. *siifolium*, podzemnih organa *H. ternatum* i *H. pyrenaicum* subsp. *pollinianum* i plodova *H. orphanidis* nisu do sada ispitivani, dok je, u odnosu na prethodna ispitivanja, u okviru ove doktorske disertacije dodatno identifikovan značajan broj ovih sekundarnih metabolita (npr. u podzemnim organima *H. sphondylium* i *H. sibiricum* po četiri, *H. verticillatum* tri, *H. montanum* pet, u plodovima *H. sphondylium* sedam, *H. sibiricum* četiri, *H. verticillatum* šest i *H. montanum* deset). Takođe, svi identifikovani furanokumarini kvantifikovani su u analiziranim izolatima. Utvrđeno je da podzemni organi i plodovi ispitivanih taksona sekcije *Heracleum* predstavljaju prevashodno značajan izvor bergaptena, koji se može koristiti kao zamena za ksantotoksin u PUVA terapiji.

Dodatni naučni doprinos ove doktorske disertacije ogleda se u tome što je multivarijantnom statističkom analizom (PCA, nMDS i UPGMA) ustanovljen hemosistematski značaj sastojaka etarskih ulja podzemnih organa, listova, cvasti i plodova, kao i furanokumarina podzemnih organa i plodova. Ispitivani taksoni grupisali su se u skladu sa taksonomskom pripadnošću.

Masne kiseline plodova *H. ternatum*, *H. pyrenaicum* subsp. *pollinianum*, *H. verticillatum* i *H. orphanidis* analizirane su po prvi put u okviru ove doktorske disertacije, dok su u slučaju plodova *H. sphondylium*, *H. sibiricum*, *H. montanum* i *H. pyrenaicum* subsp. *orsinii* postojeći podaci o kompoziciji ovih primarnih metabolita značajno upotpunjeni. Kao najznačajnije može se istaći prisustvo petroselinke kiseline, potencijalno važne sirovine za farmaceutsku, kozmetičku, prehrambenu i hemijsku industriju. Sastojci nesaponifikovane frakcije masnih ulja plodova ispitivanih taksona (tj. steroli i triterpeni) do sada nisu ispitivani (osim u slučaju *H. sphondylium*).

Antimikrobna aktivnost je testirana za 30 odabranih etarskih ulja, i to za po osam ulja podzemnih organa, listova i plodova i šest ulja cvasti ispitivanih taksona prema osam sojeva patogenih bakterija i mikromiceta, uključujući tri klinička izolata i jedan izolat iz hrane. Od analiziranih ulja, u literaturi postoje podaci jedino za aktivnost ulja plodova *H. ternatum* prema nekim od testiranih bakterija. Demonstrirana antibakterijska aktivnost 13 ispitivanih etarskih ulja (tj. osam ulja podzemnih organa, tri ulja cvasti i po jednog ulja listova i plodova) i antifungalna aktivnost 10 ispitivanih ulja (tj. po tri ulja podzemnih organa, plodova i cvasti i jednog ulja listova) može se smatrati interesantnom za dalje istraživanje (ova ulja su prema pojedinim ispitivanim bakterijama/mikromicetama bila aktivna u koncentraciji nižoj ili približnoj 0,10 mg/mL), a u nekim slučajevima aktivnost je bila uporediva sa testiranim antibioticima (streptomycinom i ampicilinom) i/ili antimikoticima (bifonazolom i ketokonazolom).

Citotoksična aktivnost 26 odabranih etarskih ulja, i to po osam ulja podzemnih organa i plodova, šest ulja listova i četiri ulja cvasti ispitivana je na ćelijskim linijama tumora (HeLa, LS174 i/ili A549). Od ispitivanih etarskih ulja, prethodno je ispitivana samo citotoksična aktivnost ulja plodova *H. ternatum*, ali prema drugim ćelijskim linijama. Deset ispitivanih ulja, i to pet iz podzemnih organa, jedno iz listova i četiri iz plodova su najmanje prema jednoj testiranoj ćelijskoj liniji tumora zadovoljila kriterijum NCI za citotoksičnost ($IC_{50} < 30,00 \mu\text{g/mL}$). Etarska ulja su pokazala zadovoljavajuću selektivnost, ispitivanu na normalnim MRC-5 ćelijama.

Od 14 testiranih etarskih ulja, pet iz podzemnih organa i tri iz plodova pokazala su slabu sposobnost neutralizacije DPPH radikala. TLC-DPPH testom je ustanovljeno da dominantni sastojci ispitivanih ulja - monoterpenski ugljovodonici ili alifatični estri, nisu glavni nosioci pokazane aktivnosti (u anti-DPPH zonama najzastupljeniji su bili oksidovani terpeni i fenilpropani).

Doktorska disertacija pod nazivom „**Hemijska i farmakološka karakterizacija odabranih taksona roda *Heracleum* L. (Apiaceae), autohtonih za jugoistočnu Evropu**“, kandidata dipl. farm. Ljuboša J. Ušjaka predstavlja naučno delo od izuzetnog značaja. Doprinosi u velikoj meri boljem poznavanju kompozicije odgovarajućih sekundarnih i primarnih metabolita osam analiziranih predstavnika sekcije *Heracleum*, dok su ispitivanja *H. austriacum* subsp. *siifolium* iz

sekcije *Wendia* sprovedena po prvi put. Utvrđeno je da su ispitivani taksoni potencijalno novi biljni izvori jedinjenja značajnih za farmaceutsku, kozmetičku, prehrambenu ili hemijsku industriju. Za komponente etarskih ulja i furanokumarine multivarijantnom statističkom analizom ustanovljeno je da imaju hemosistematski značaj. Rezultati ispitivanja antimikrobne, citotoksične i antioksidantne aktivnosti etarskih ulja ukazali su na opravdanost daljih istraživanja ovih izolata kao potencijalno novih lekovitih biljnih sirovina, uz uslov poštovanja ustanovljenih maksimalnih dozvoljenih dnevnih unosa za ona etarska ulja u kojima su detektovani furanokumarini.

Iz rezultata koji predstavljaju deo ove doktorske disertacije publikovano je pet radova u časopisima međunarodnog značaja: jedan rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), dva rada u istaknutim međunarodnim časopisima (M22), kao i dva rada u međunarodnim časopisima (M23), a jedan je prihvaćen za štampu u istaknutom međunarodnom časopisu (M22). Prikazano je sedam saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampana u izvodu (M34) i četiri saopštenja na skupovima nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64).

Na osnovu svega izloženog, Komisija sa velikim zadovoljstvom predlaže Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu-Farmaceutskog fakulteta da prihvati pozitivan izveštaj o završenoj doktorskoj disertaciji pod nazivom „**Hemijska i farmakološka karakterizacija odabranih taksona roda *Heracleum* L. (Apiaceae), autohtonih za jugoistočnu Evropu**“ i kandidatu dipl. farm. Ljubošu J. Ušjaku odobri javnu odbranu po dobijanju saglasnosti Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu.

Prof. dr Silvana Petrović, redovni profesor, mentor
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Dr sc. Milica Drobac, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Dr sc. Marina Soković, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu,
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Dr sc. Tatjana Stanojković, viši naučni saradnik
Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Beograd

Dr sc. Marjan Niketić, naučni i muzejski savetnik
Prirodnjački muzej, Beograd