



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU, BIOHEMIJU I
ZAŠTITU ŽIVOTNE SREDINE



MR NATAŠA SIMIN

SEKUNDARNI BIOMOLEKULI U VRSTAMA *ALLIUM*
SECT. *CODONOPRASUM* RCHB. –
BIOLOŠKE AKTIVNOSTI, FITOHEMIJSKI I
HEMOTAKSONOMSKI ASPEKTI

-DOKTORSKA DISERTACIJA-

NOVI SAD, 2014.

Predgovor

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u laboratorijama za biohemiju lekovitog bilja i tečnu hromatografiju Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, zatim u laboratoriji za mikrobiologiju Biološkog fakulteta u Beogradu, laboratoriji za ćelijske kulture Instituta za onkologiju Vojvodine u Sremskoj Kamenici i laboratorijama za mikrobiologiju i gasnu hromatografiju Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, a u okviru realizacije projekta Ministarstva prosvete i nauke br. ON172058.

Koristim ovu priliku da se zahvalim svima onima koji su dali doprinos izradi moje doktorske disertacije.

*Na prvom mestu zahvaljujem se mom mentoru **prof. dr Nedi Mimici-Dukić** na svemu što sam od nje naučila o biohemiji, nauci, poslovnom ponašanju i životnom stilu. Takođe joj se zahvaljujem za bezuslovno poverenje koje je uvek imala u mene, za podstrek i neprestanu podršku koju mi pruža od početka našeg zajedničkog rada. Njena velika životna energija i pozitivan duh učinili su posao kojim se bavim lepšim i lakšim.*

***Doc. dr Dejanu Orčiću** zahvaljujem se na pomoći u eksperimentalnom radu, pomoći prilikom obrade podataka hromatografskih analiza i na mnogobrojnim stručnim i tehničkim savetima prilikom pisanja teze.*

***Dr Dragani Mitić-Ćulafić** i ostalim kolegama sa Katedre za mikrobiologiju Biološkog fakulteta u Beogradu zahvaljujem se na pomoći u eksperimentalnom radu i obradi rezultata koji se odnose na antibakterijsko, antimitogeno i genotoksično delovanje.*

***Dr Dragani Četojević-Simin** zahvaljujem se na pomoći u eksperimentalnom radu i obradi rezultata koji se odnose na citotoksično delovanje i apoptozu.*

***Prof. dr Biljani Božin** i **doc. dr Goranu Anačkovu** zahvaljujem se na pomoći pri izboru teme, kao i za sakupljanje i determinaciju biljnog materijala.*

***Msc Kristini Bekvalac**, **dr Emiliji Svirčev**, **doc. dr Ivani Beari**, **doc. dr Mariji Lesjak** i **Marini Francišković** zahvaljujem se na pomoći u eksperimentalnom radu, na podršci, prijateljstvu i dobroj atmosferi na poslu.*

***Svim kolegama** sa Katedre za biohemiju i hemiju prirodnih proizvoda hvala za pomoć i podršku u toku izrade ovog rada.*

***Svojoj porodici** se od srca zahvaljujem na razumevanju, podršci i ljubavi.*

mr Nataša Simin

SADRŽAJ

1. Uvod	1
2. Opšti deo	5
2.1 Pozicija roda <i>Allium</i> L. 1753 u filogenetskom sistemu.....	7
2.2 Opšte odlike roda <i>Allium</i> L.....	7
2.2.1 Sekcija <i>Codonoprasum</i>	8
2.2.1.1 <i>Allium flavum</i> L. 1753.....	9
2.2.1.2 <i>Allium carinatum</i> L. 1753	10
2.2.1.3 <i>Allium melanantherum</i> Panč. 1883	10
2.2.1.4 <i>Allium paniculatum</i> L. 1759 subsp. <i>marginatum</i> (Janka) Soó 1972	12
2.2.1.5 <i>Allium pallens</i> L. 1762 subsp. <i>tenuiflorum</i> (Ten.) Stearn 1978 (<i>A. tenuiflorum</i> Ten. 1811)	12
2.2.1.6 <i>Allium oleraceum</i> L. 1753.....	12
2.2.1.7 <i>Allium fuscum</i> Waldst. et Kit. 1807	13
2.2.1.8 <i>Allium rhodopeum</i> Velen. 1890 (<i>Allium paniculatum</i> L. subsp. <i>villosulum</i> (Halácsy) Stearn)	13
2.2.2 Sekcija <i>Allium</i>	14
2.2.2.1 <i>Allium sativum</i> L. 1753	14
2.2.3 Sekcija <i>Cepa</i> (Mill.) Prokh.....	15
2.2.3.1 <i>Allium cepa</i> L.	15
2.3 Hemijski sastav vrsta roda <i>Allium</i>	16
2.3.1 Organosumporna jedinjenja.....	16
2.3.2 Organoselenova jedinjenja	23
2.3.3 Fenolna jedinjenja	25
2.3.4 Saponini.....	36
2.3.5 Hemotaksonomska istraživanja vrsta roda <i>Allium</i>	38
2.4 Molekulske osnove bolesti	40
2.4.1 Oksidativni stres	40
2.4.1.1 Uloga i toksično delovanje RS u organizmu.....	42
2.4.1.2 Antioksidansi i određivanje antioksidantnog potencijala.....	43
2.4.2 Mutageneza.....	49
2.4.2.1 Antimutageni i metode za ispitivanje antimutagenog potencijala.....	51
2.4.2.2 Potencijalno prooksidantno delovanje antioksidanasa i genotoksičnost.....	53
2.4.3 Inflamacija i medijatori inflamacije.....	54

2.4.4	Kancer i ćelijska smrt	61
2.4.4.1	Tipovi ćelijske smrti.....	61
2.4.4.2	Inhibicija apoptoze u tumorskim ćelijama	64
2.4.4.3	Metode za ispitivanje ćelijske smrti	66
2.5	Farmakološke aktivnosti i medicinski značaj vrsta roda <i>Allium</i>	69
2.5.1	Antimikrobna aktivnost	69
2.5.2	Antioksidantna aktivnost	71
2.5.3	Antiinflamatorna aktivnost	72
2.5.4	Antitumorska i antikancerogena aktivnost	75
2.5.5	Ostale farmakološke aktivnosti.....	78
3.	Eksperimentalni deo	81
3.1	Specifične hemikalije i reagensi korišćeni u eksperimentima.....	83
3.2	Biljni materijal.....	83
3.3	Priprema ekstrakata	84
3.3.1	Metanolni ekstrakti	84
3.3.2	Ekstrakti za određivanje antocijana	86
3.4	<i>Headspace</i> GC-MS (HS-GC-MS) analiza volatilnih komponenti	86
3.5	LC-DAD-MS i LC-MS-MS analiza	87
3.6	Kvantitativno određivanje odabranih fenolnih jedinjenja LC-MS/MS tehnikom ..	88
3.7	Određivanje sadržaja ukupnih monomernih antocijana	90
3.8	Određivanje aktivnosti aliinaze	91
3.9	Ispitivanje antioksidantnog potencijala ekstrakata.....	92
3.9.1	Određivanje ukupnog redukcionog potencijala	92
3.9.2	Ispitivanje sposobnosti hvatanja DPPH radikala	93
3.9.3	Ispitivanje sposobnosti hvatanja ABTS ⁺ (Totalni antioksidantni status).....	94
3.9.4	Određivanje sposobnosti hvatanja hidroksil radikala ESR tehnikom.....	95
3.9.5	Određivanje kapaciteta „hvatanja“ NO [•] radikala	97
3.9.6	Određivanje sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije	98
3.10	Ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti ekstrakata	100
3.11	Određivanje antibakterijske aktivnosti ekstrakata	101
3.12	Određivanje antiviralne aktivnosti ekstrakata.....	104
3.13	Određivanje antimutagene aktivnosti ekstrakata	104
3.14	Ispitivanje genotoksičnog efekta ekstrakata	105
3.15	Određivanje antitumorske aktivnosti ekstrakata	108
3.15.1	Ispitivanje antiproliferativne aktivnosti ekstrakata	109
3.15.2	Ispitivanje mehanizma ćelijske smrti.....	110

4. Rezultati i diskusija	113
4.1 Hemijski sastav vrsta roda <i>Allium</i> sect. <i>Codonoprasum</i>	115
4.1.1 <i>Headspace</i> GC-MS (HS-GC-MS) analiza volatilnih komponenti	115
4.1.2 Kvalitativna analiza metanolnih ekstrakata primenom LC-DAD-MS i LC-MS-MS	117
4.1.3 Kvantitativna analiza odabranih fenolnih jedinjenja primenom LC-MS/MS tehnike	124
4.1.4 Sadržaj ukupnih monomernih antocijana	138
4.1.5 Aktivnost alinaze	139
4.2 Antioksidantna aktivnost ekstrakata	140
4.3 Antiinflamatorna aktivnost ekstrakata	149
4.4 Antimikrobna aktivnost ekstrakata	156
4.4.1 Antibakterijska aktivnost ekstrakata	156
4.4.2 Antiviralna aktivnost ekstrakata	158
4.5 Antimutagena aktivnost ekstrakata	159
4.6 Genotoksični efekat ekstrakata	162
4.7 Uticaj ekstrakata vrsta roda <i>Allium</i> na rast zdravih i tumorskih ćelija i detekcija tipa ćelijske smrti	165
5. Zaključak	173
6. Summary	179
7. Literatura	185
8. Prilog	213
8.1 Podaci o uzorcima	215
8.2 <i>Headspace</i> GC-MS analiza	216
8.3 LC-DAD-MS i LC-MS-MS analiza	221
8.4 Kvantitativna analiza odabranih fenolnih jedinjenja u ekstraktima LC-MS/MS metodom	243
8.5 Određivanje ukupnih monomernih antocijana	266
8.6 Određivanje aktivnosti alinaze	267
8.7 Antioksidantni potencijal ekstrakata	268
8.8 Antiinflamatorni potencijal ekstrakata	301
8.9 Antimutagena aktivnost ekstrakata	312
8.10 Genotoksični efekat ekstrakata	313
8.11 Uticaj ekstrakata na rast zdravih i tumorskih ćelija	316

1. Uvod

Istraživanja lekovitog bilja u cilju valorizacije njegove upotrebe u savremenoj medicini izuzetno su inenzivna tokom poslednjih četrdeset godina, jer se pokazalo da većina lekova biljnog porekla ima manje neželjenih dejstava od sintetskih lekova. Iskustva tradicionalne medicine, kao i rezultati bioloških, hemijskih i farmakoloških ispitivanja ukazali su na značajnu biološku aktivnost biljnih ekstrakata i omogućili izolovanje i karakterizaciju aktivnih komponenti, od kojih se mnoge primenjuju u savremenoj farmakoterapiji. Određivanje biološke aktivnosti i hemijska karakterizacija do sada neispitanih biljnih vrsta vode ka otkrivanju novih prirodnih proizvoda sa potencijalom za primenu u prevenciji i terapiji različitih obolenja.

Mnoga epidemiološka istraživanja pokazala su da ishrana bogata voćem, povrćem i začinima smanjuje rizik od određenih bolesti (Ren i drugi, 2003; Steinmetz i Potter, 1996; Law i Morris, 1998; Riboli i Norat, 2003). Ovde pre svega spadaju bolesti u čijoj patofiziologiji se nalazi oksidativni stres, kao što su: kardiovaskularne bolesti, ateroskleroza, neurodegenerativne bolesti (Alchajmerova i Parkinsonova bolest), reumatoidni artritis, multipla skleroza, prerano starenje i kancerogena obolenja (Soobrattee i drugi, 2005; Bazzano i drugi, 2001). Uloga sekundarnih biomolekula biljaka, naročito polifenola, u prevenciji ovih bolesti pripisivana je prvenstveno njihovoj izraženoj antioksidantnoj aktivnosti (Mimica-Dukić, 1997; Heim i drugi, 2002), koja je dokazana u mnogobrojnim *in vitro* testovima (Rice-Evans i drugi, 1996). Međutim, svakim danom otkriva se sve više novih mehanizma preko kojih sekundarni metaboliti biljaka ispoljavaju svoje delovanje u zaštiti organizma. Ovi mehanizmi obuhvataju modifikacije signalnih puteva, moduaciju ekspresije gena, hemoprevenciju, uticaj na procese ćelijske deobe i smrti, aktivaciju ili inhibiciju enzima, stimulaciju imunog odgovora organizma, epigenetske mehanizme, itd. Tako je za mnoga fenolna jedinjenja biljaka dokazano da ispoljavaju antiinflamatornu (Erlejan i drugi, 2008), antiproliferativnu (Haddad i drugi, 2006), antimutagenu (Steiner i drugi, 2007), antigenotoksičnu (Bhour i drugi, 2011), estrogenu (Dixon i Ferreira, 2002), antimikrobnu (Cushnie i Lamb, 2005) i antialergenu aktivnost (Kawai i drugi, 2007), smanjuju nivo holesterola u krvi i krvni pritisak (Anderson i drugi, 1999; Kris-Etherton i drugi, 2004). Sve ovo ukazuje da su biljke neiscrpan izvor biološki aktivnih jedinjenja i da su fitohemijska i biohemijska istraživanja u oblasti lekovitog bilja veoma značajna i aktuelna.

Biljke roda *Allium*, kako gajene tako i samonikle, od davnina imaju važno mesto u čovekovoj ishrani, kao i u tradicionalnoj i oficinalnoj medicini. Ove biljke predstavljaju bogat izvor biološki aktivnih molekula, u koje spadaju organosumporna, fenolna i organoselenova jedinjenja, steroidni saponini, vitamini i amino kiseline (Brewster i Rabinowich, 1990; WHO, 1999; Kovačević, 2002). Najpoznatije gajene vrste ovog roda, beli (*A. sativum* L.) i crni luk (*A. cepa* Linn.), imaju široku primenu kao začinske, salatne i lekovite biljke i veoma su dobro ispitane kako sa aspekta hemijskog sastava tako i u pogledu bioloških aktivnosti. Dokazano je da beli luk ispoljava antimikrobno, antioksidantno, anti-inflamatorno, antikancerogeno delovanje, smanjuje rizik od kardiovaskularnih obolenja, stimuliše imuni odgovor (Vulinović-Zlatan, 2004; Lanzotti, 2006; Yin i Tsao, 1997; Božin, 2009; Park, 2011; Yang i drugi, 2001; Thomson i Ali, 2003; Herman-Antosiewicz i Singh, 2004; Whitmore i Naidu, 2000; Benkeblia, 2004; Lau drugi, 1991; Lamm i Rigs, 2000). Crni luk ima izraženu antioksidantnu, antidiabetesnu, anti-inflamatornu, antikancerogenu, antimikrobnu i antihiperlipidemičnu aktivnost zahvaljujući prisustvu flavonoida (kvercetin, kemferol, miricetin, antocijanin) i organosumpornih jedinjenja (Kundan i Anupam, 2009). U ishrani ljudi širom sveta zastupljeni su još i praziluk (*A. porrum* L.), aljma ili zimski luk (*A. fistulosum* L.), kozjak (*A. cepa* var. *aggregatum*, *A. ascalonicum* Hort.), sremuš (*A. ursinum* L.), luk biserac (*A. ampeloprasum* L.), vlašac (*A. schoenoprasum* L.) i kineski vlašac (*A. tuberosum* L.) (Lanzotti, 2006). Pored ovih najpoznatijih vrsta, rod *Allium* obuhvata još oko 750 samoniklih vrsta

(Fritsch i drugi 2006), koje sve spadaju u jestive biljke i imaju sličan ukus i miris kao i gajene vrste, a rasprostranjene su uglavnom na severnoj hemisferi, najviše u južnoj Evropi i zapadnoj Aziji (Fritsch i Friesen, 2002). Međutim, o ovim vrstama postoje vrlo oskudni podaci u naučnoj literaturi ili su potpuno neispitane.

U Srbiji raste 33 vrste iz roda *Allium* (Stevanović i drugi, 1995), među kojima je i 10 taksona iz sect. *Codonoprasum* (*A. carinatum* subsp. *pulchellum*, *A. carinatum* subsp. *carinatum*, *A. fuscum* var. *gracile*, *A. fuscum* var. *fuscum*, *A. flavum* subsp. *flavum*, *A. melanantherum*, *A. paniculatum* subsp. *marginatum*, *A. pallens* subsp. *tenuiflorum*, *A. oleraceum* i *A. rhodopeum*). O njihovom rasprostranjenju i botaničkim karakteristikama postoje literaturni podaci (Anačkov, 2009; Tatić, 1975), dok su hemijski sastav i biološke aktivnosti delimično ispitani samo za vrstu *A. flavum* (Štajner i drugi, 2006; 2008; 2009; Curcic i drugi, 2012). S obzirom da su ostale vrste sect. *Codonoprasum* potpuno neispitane, a da njihovi bliski rođaci crni i beli luk ispoljavaju čitav spektar bioloških aktivnosti, postoji potreba da se ispita hemijski sastav i potencijalna lekovitost ovih vrsta. Rezultati hemijskih analiza mogu istovremeno da doprinesu i definisanju hemotaksonomskih markera za date vrste i time olakšaju njihovu botaničku klasifikaciju.

Zbog toga je za predmet istraživanja ove doktorske disertacije odabrano ispitivanje hemijskog sastava i biološkog potencijala 10 taksona iz roda *Allium* sect. *Codonoprasum*, koje samoniklo rastu na teritoriji Srbije. Istraživanja su obuhvatila:

- detaljnu analizu hemijskog sastava, uključujući:
 - analizu volatilnih komponenti svežih lukovica primenom *headspace* GC-MS tehnike
 - kvalitativnu analizu metanolnih ekstrakata primenom tečnehromatografskih metoda (LC-DAD-MS i LC-MS-MS)
 - kvantitativnu analizu odabranih fenolnih jedinjenja LC-MS-MS tehnikom
 - određivanje sadržaja monomernih antocijana u ekstraktima
 - određivanje aktivnosti aliinaze
- ispitivanja bioloških aktivnosti ekstrakata, gde su uključeni:
 - određivanje antioksidantne aktivnosti kombinacijom nekoliko različitih metoda (ukupni redukcionni potencijal, neutralizacija DPPH• radikala, sposobnost hvatanja NO, ABTS•+ i OH• radikala i sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije)
 - *ex vivo* određivanje antiinflamatorne aktivnosti metanolnih ekstrakata merenjem potencijala inhibicije biosinteze metabolita arahidonske kiseline u humanim trombocitima
 - određivanje antibakterijske aktivnosti ekstrakata na odabranim Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama i antiviralne aktivnosti na dva bakteriofaga specifična za bakteriju *Pseudomonas aeruginosa*
 - određivanje antimutagene aktivnosti ekstrakata na spontanu i *t*-BOOH indukovanu mutagenezu u *E. coli* IC202
 - ispitivanje genotoksičnog efekta ekstrakata na zdrave i tumorske ćelije
 - ispitivanje uticaja ekstrakata na rast zdravih i tumorskih ćelija i detekcija tipa indukovane ćelijske smrti
- korelaciju biološke aktivnosti sa hemijskim sastavom i pronalaženje hemotaksonomskih markera

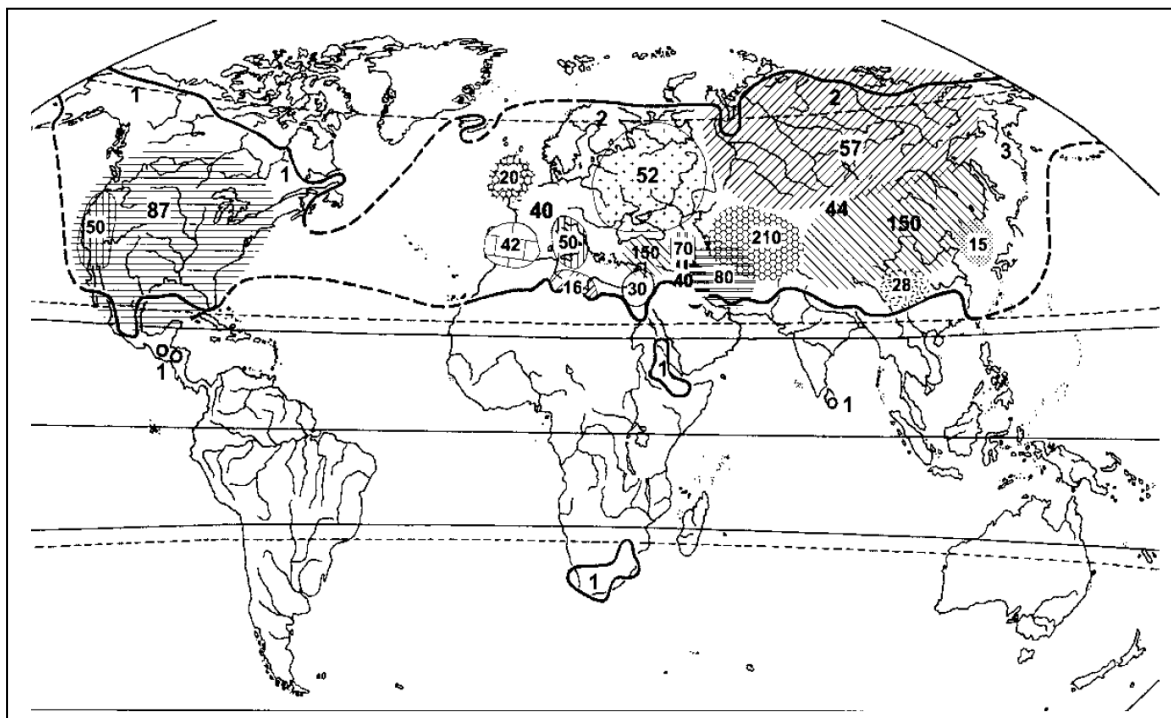
2. Opšti deo

2.1 POZICIJA RODA *ALLIUM* L. 1753 U FILOGENETSKOM SISTEMU

Sistematska pozicija roda *Allium* L. je aktuelan problem u filogenetskoj sistematici monokotiledonih biljaka, jer se po nekim autorima ovaj rod svrstava u familiju Alliaceae J. Agardh 1858, red Amaryllidales, nadred Lillanae, podklasa Liliidae, klasa Liliopsida (Takhtajan, 1997), dok se prema drugim autorima svrstava u tribus Allieae Dumort, podfamilija Allioideae Herb., familija Amaryllidaceae J.St.-Hil, red Asparagales Link 1829, klasa Liliopsida, razdeo Angiospermae (Chase i drugi, 2009; APG III, 2009). Rod *Allium* obuhvata 72 sekcije svrstane u 15 podrodova (Fritsch i drugi 2006). Jedan od dominantnih podrodova je podrod *Allium* koji obuhvata 12 sekcija, od kojih su tri najvažnije: sect. *Allium*, koja je najveća, zatim veoma raznovrsna sect. *Scorodon* i homogena sect. *Codonoprasum*, koja je i predmet ispitivanja u ovoj doktorskoj disertaciji.

2.2 OPŠTE ODLIKE RODA *ALLIUM* L. 1753

Procenjuje se da rod *Allium* L. broji oko 780 vrsta (Fritsch i drugi 2006), što ga čini jednim od najvećih rodova monokotiledonih biljaka. Vrste ovog roda rasprostranjene su uglavnom na severnoj hemisferi u holarktičkom regionu, od borealne do subtropske zone (Slika 2.1.) (Fritsch i Friesen, 2002).



Slika 2.1. Rasprostranjenje divljih vrsta roda *Allium* u svetu. Brojevi na slici označavaju brojeve vrsta zastupljenih u svakom regionu (Fritsch i Friesen, 2002)

Na južnoj hemisferi do sada je poznata samo jedna vrsta (Wilde-Duyfjes, 1973). Najbogatije područje je umerenotoplo područje prednje Azije. U Evropi, najveći broj vrsta raste u Sredozemnoj oblasti, u južnim delovima nekadašnjeg SSSR-a i u region Kavkaza. Većina vrsta u Africi je orijentisana prema obalama Sredozemnog mora, dok u Severnoj Americi raste oko 90 vrsta, koje su uglavnom rasprostranjene u južnim delovima (Fritsch i Friesen, 2002). Neke vrste predstavljaju ishodišne taksone za gajene oblike koji se široko u svetu koriste kao jestive i začinske biljke. Pojedine od njih su i veoma cenjene lekovite biljke. U Evropi je do sada zabeleženo 110 vrsta,

svrstanih u 13 sekcija (Stearn, 1978; 1980). Na teritoriji Srbije raste 27 autohtonih vrsta, od kojih se šest javljaju sa po dve podvrste, tako da je ukupan broj vrsta i podvrsta 33. Ove vrste raspoređene su u sedam podrodova i devet sekcija (Anačkov, 2009). U ovom radu ispitivano je devet vrsta podroda *Allium* (osam vrsta iz sekcije *Codonoprasum* i vrsta *A. sativum* iz sect. *Allium*), kao i vrsta *A. cepa* iz podroda *Cepa*.

Rod *Allium* obuhvata uglavnom višegodišnje, zeljaste biljke, većinom sa lukovicom, listolikom ili krtolastom lukovicom, ponekad sa zadebljalim rizomom. Visina im se kreće od 5 do 150 cm, dok veličina lukovice može da varira od 2-3 mm do 8-10 cm u prečniku. Listovi su uglavnom prizemni, najčešće sedeći, retko sa izbrazdanom drškom. Liske su ravne, sa gornje strane olučaste, na naličju ređe oštro rebraste, ponekad poluokrugle do sasvim okrugle. Pri osnovi su najčešće šuplje, gole, retko po obodu grubo trepljave. Cvast je štitolika do loptasta, najčešće sa sraslim omotačem (spatom) sačinjenim iz dva do tri listolika priperka koji u početku potpuno obavijaju cvast. U regionu cvasti pojedini cvetovi se često transformišu u rasplodne lukovice. Cvetovi su srazmerno sitni, često na dugačkim drškama. Listići zvonastog perigona su uspravno postavljeni, slobodni ili pri osnovi srasli. Svi delovi biljke odaju karakterističan miris zbog prisustva sumpornih jedinjenja (Tatić, 1975; Stearn, 1980).

Većina vrsta je proteandrična. Prašnika je šest koji su pri osnovi sraslih sa listićima perigona. Unutrašnji prašnici mogu biti prosti, kod pojedinih vrsta pri bazi zaokruženi ili blago prošireni, dok se kod pripadnika tipične sekcije javljaju široki (listoliki) prašnici koji pored središnjeg zupca koji nosi anteru imaju i dva manje-više duga izraštaja (zubića). Antere su pričvršćene za prašnički konac sa dorzalne strane. Stubić je končast, pri dnu do plodnika sa kanalom. Žig je zaobljen, nešto proširen. Nektar koji izlučuju žlezde plodnika sakuplja se pri osnovi cveta, između plodnika i tri unutrašnja prašnika. U zatvorenim cvetovima često dolazi do samooprašivanja. Plod je trostrana trooka čaura u svakom okcu sa po 1–2 (retko sa više) ovalnih ili rebrastih semena (Tatić, 1975).

Vrste ovog roda uglavnom preferiraju otvorena, sunčana i suva staništa i vrlo retko rastu na područjima sa gustom vegetacijom. Lukovi su uglavnom slabi receptori sunčeve svetlosti i zbog toga ne mogu da se takmiče sa korovskim vrstama u usevima i da rastu u senci (Block, 2009).

2.2.1 Sekcija *Codonoprasum*

Sekcija *Codonoprasum* Reichenb. uključuje ranije nezavisne sekcije Sect. *Macrospatha* G. Don ex Kunth, Sect. *Rynchoprasum* F. Hermann, Sect. *Haemoprasum* F. Hermann i Sect. *Phalerea* Zahar (Friesen i drugi, 2006). Stearn (1980) je u ovu sekciju svrstao 22 vrste (Tabela 2.1.), od kojih se neke javljaju sa dve ili više podvrsta. Međutim, u narednim godinama opisano je još novih vrsta iz ove sekcije, kao što su: *A. platakisii* Tzanoudakis et Kypriotakis (Tzanoudakis i Kypriotakis, 1993), *A. oporinanthum* Brullo et al. (Brullo i drugi, 1997), *A. dirphianum* Brullo et al., *A. phitosianum* Brullo et al., *A. rausii* Brullo et al. (Brullo i drugi, 2003), *A. croaticum* Bogdanovic et al. (Bogdanovic i drugi, 2008), *A. aeginiense* Brullo et al. (Brullo i drugi, 2008). U flori Srbije zastupljeno je osam vrsta iz sekcije *Codonoprasum* i to: široko rasprostranjene *A. flavum* i *A. carinatum*, *A. paniculatum*, *A. fuscum* i *A. oleraceum*, koje se sporadično javljaju, i *A. rhodopeum*, *A. pallens* subsp. *tenuiflorum* i *A. melanatherum*, koje spadaju u retke taksone (Anačkov, 2009). Zabeleženo je da su listovi, cvetovi i lukovice nekih od ovih vrsta (*A. flavum* i *A. carinatum*) jestive, da imaju blaži ukus i miris od crnog luka i da se sitno seckani mogu dodavati u supe, čorbe i salate (Grlić, 1986; Sholto-Douglas, 1978). Takođe, vrste ove sekcije (*A. flavum*, *A. carinatum*) se veoma lako i često gaje kao ukrasne biljke (Davies, 1992).

Tabela 2.1. Predstavnicu sekcije *Codonoprasum* (Stearn, 1980)

Sect. <i>Codonoprasum</i> Reichenb. (incl. Sect. <i>Macrospatha</i> G. Don ex Kunth, Sect. <i>Rynchoprason</i> F. Hermann, Sect. <i>Haemoprason</i> F. Hermann i Sect. <i>Phalerea</i> Zahar)	<i>A. paniculatum</i> L. 1759
	<i>A. pallens</i> L. 1762
	<i>A. convallarioides</i> Grossh. 1924
	<i>A. sipyleum</i> Boiss. 1844
	<i>A. rupestre</i> Steven 1812
	<i>A. favosum</i> Zahar. 1975
	<i>A. macedonicum</i> Zahar. 1975
	<i>A. podolicum</i> Blocki ex Racib. & Szafer 1919
	<i>A. oleraceum</i> L. 1753
	<i>A. parnassicum</i> (Boiss.) Haláchy 1904
	<i>A. staticiforme</i> Sibth. & Sm. 1809
	<i>A. pilosum</i> Sibth. & Sm. 1809
	<i>A. luteolum</i> Haláchy 1904
	<i>A. flavum</i> L. 1753
	<i>A. melanantherum</i> Pančić 1883
	<i>A. tardans</i> W. Greuter & Zahar. 1975
	<i>A. carinatum</i> L. 1753
	<i>A. myrianthum</i> Boiss. 1844
	<i>A. hirtovaginum</i> P. Candargy 1897
	<i>A. hymettium</i> Boiss. & Heldr. 1859
	<i>A. stamineum</i> Boiss. 1859
	<i>A. amphipulchellum</i> Zahar. 1975
	<i>A. paniculatum</i> L. 1759

2.2.1.1 *Allium flavum* L. 1753

Najrasprostranjenija vrsta roda *Allium* u flori Srbije je *A. flavum* i to podvrsta subsp. *flavum* L. Nalazi se gotovo u svim tipovima vegetacije, a prvenstveno nastanjuje kserofilne livade i kamenjare (Anačkov, 2009). Druga podvrsta subsp. *tauricum* (Besser ex Rchb.) K. Richt je retka biljka u Srbiji.

Takson *A. flavum* subsp. *flavum* je višegodišnja biljka, 10–60 cm visoka (Slika 2.2.). Lukovica je jajolika sa jako izduženim u gornjem delu vlaknasto izdeljenom tunikom. Stablo je ovalno, uspravno ili češće povijeno ustajuće. Lišće sa polucilindričnim drškama, kasnije šupljim, uzano linearno, golo, odozgo slabo olučasto, sa plavičastim prugama do 2 mm široko, iste dužine ili kraće od stabla. Spata je dvolisna, prilično čvrsta, debela, uzanolinearna do skoro čekinjasta, često vise puta duža od mnogocvetne prilično rastresite cvasti, jedan listić obično znatno duži. Cvast je monocvetna i prilično rastresita, bez rasplodnih lukovica. Cvetne drške su tanke, skoro končaste, do 3 puta duže od perigona. Listići perigona su duguljasti, žuti, 4–5 mm dugački, tupi i sjajni. Prašnici su do dva puta duži od listića perigona, srasli međusobno, a i sa listićima perigona. Stubić se izdiže izvan cvetova, plod jajasta čaura, izuzetno trostrana. Raste u Francuskoj, Španiji, Italiji, na Balkanskom poluostrvu i u južnim delovima evropske Rusije, Kavkazu i zapadnoj Aziji (Tatić, 1975).

2.2.1.2 *Allium carinatum* L. 1753

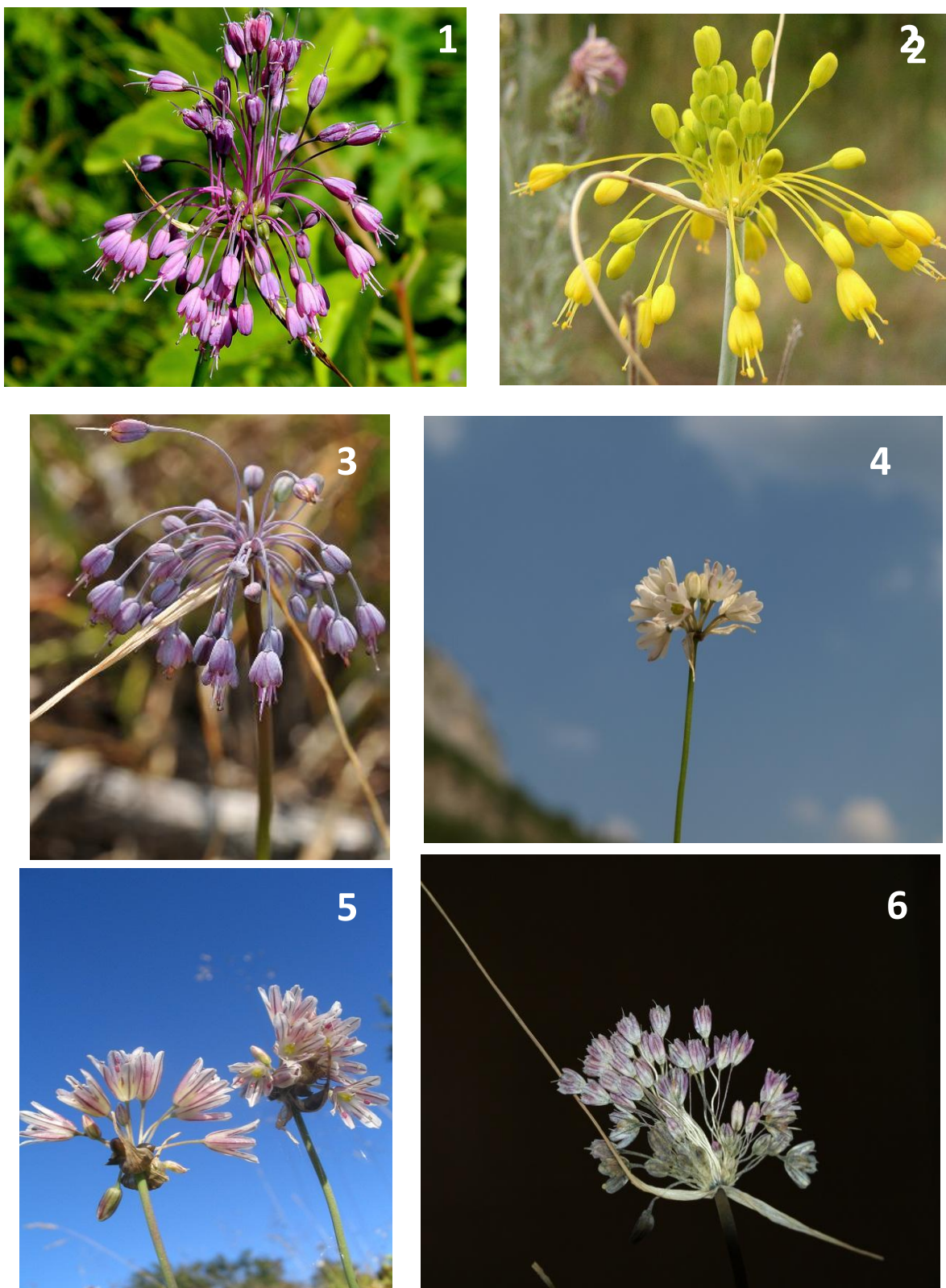
Veoma česta vrsta u Srbiji je *A. carinatum* sa dve podvrste subsp. *carinatum* i subsp. *pulchellum* (G. Don) Bonnier et Layens. Obe podvrste se mogu naći u veoma različitim tipovima vegetacije (Anačkov, 2009). Podvrste se razlikuju po tome što subsp. *carinatum* ima u cvasti vegetativne bulbile, a subsp. *pulchellum* ima hrapav rub lista.

Takson *A. carinatum* subsp. *carinatum* je višegodišnja biljka, 30–60 cm visoka (Slika 2.2.). Lukovica je jajasta, 1–1,5 cm u prečniku sa mrkom tunikom izdijeljenom na uzdužne trake. Lišće je uzano do široko linearno, ravno, odozgo slabo olučasto, 2–4 mm široko, na vrhu tupo, po obodu glatko ili fino nazubljeno, odozdo sa 3–5 izrazito štrčeća nerva. Spata je dvolisna. Cvast je rastresita, prilično krupna i mnogocvetna sa rasplodnim lukovicama. Cvetne drške su veoma dugačke (do 4 cm), tanke i oborene naniže. Perigon je jajast. Listići perigona su zaobljeni, 2–7 mm dugački i vrhovima povijeni ka unutrašnjosti, svetlozeleni, crveni do zatvorenljubičasti sa istaknutim rebrima. Prašnici su prosti, skoro duplo duži od listića perigona. Stubić je neznatno duži od listića perigona. Biljka raste po travnatim površinama, listopadnim šumama nižeg regiona i kamenjarima. Rasprostranjena je na Balkanskom poluostrvu, priobalnoj zoni oko Crnog mora, na Krimu, Kavkazu i na Istoku sve do Irana (Tatić, 1975).

Takson *A. carinatum* subsp. *pulchellum* je takođe višegodišnja biljka, 20–60 cm visoka (slika 2.2.). Lukovica je duguljasto jajasta, malo zadebljala. Stablo je uspravno i skoro do sredine lisnato. Lišće je uskolinearno, široko oko 1 mm, obodom fino hrapavo, sa gornje strane izbrazdano jednake dužine, ili nešto duže od stabla. Spata je dvolisna, jedan deo joj je znatno duži od drugog, prevazilazi širinu cvasti i unazad je povijena. Cvetne drške su tanke, nejednake dužine, nekoliko puta duže od perigona. Perigon je zvonast sa listićima duguljasto-eliptičnim, 4–5 mm dugačkim, tupim, živo crvenkasto-ljubičastim do crvenim i rebrastim. Prašnici su prosti. Prašnice su svetlo ljubičaste. Polenova zrna su žuta. Stubić znatno nadmašuje perigon. Raste po kamenjarima, u severnoj Francuskoj, na Pirinejskom poluostrvu, Italiji, na Balkanskom poluostrvu, južnim delovima evropske Rusije, Kavkazu, maloj Aziji i severnoj Africi.

2.2.1.3 *Allium melanantherum* Panč. 1883

Vrsta *A. melanantherum* je višegodišnja biljka, 20–40 cm visoka (Slika 2.2.). Lukovica je jajasta, prosta sa izdijeljenom skoro crnom spoljašnjom tunikom. Vlakna tunike su skoro uporedna. Stablo je tanko, cilindrično, uspravno, uzano-linearno, 1–1.5 mm široko, po obodu nazubljeno, odozgo žljebovito i odozdo sa istaknutim rebrom. Spata je dvolisna, rasečena, bazalni delovi su široko meškoliko naduvani sa 5–7 nerava i u gornjem delu izvučeni u bodlju. Cvast je mnogocvetna, rastresita sa mnogobrojnim rasplodnim lukovicama. Cvetne drške gotovo jednake dužine, ređe su iste dužine sa listićima perigona, a ponekad i dva puta duže. Perigon je cilindričan, 7–10 mm dugačak, sa bledecrvenkastim zatupastim listićima sa tamno crvenim istaknutim rebrima. Prašnici su znatno kraći od listića perigona. Prašnički konci su šilasti. Prašnice eliptične, olovnosive do mrke. Plodnik je duguljast. Semena su sivomrka. Biljka raste na sušnim visokoplaninskim pašnjacima, u Bugarskoj i južnoj Srbiji. Endemična je vrsta Balkanskog poluostrva. U Srbiji je nađena oko Vlasinskog jezera, na Staroj planini, na planinama u okolini Vranja i na severnim padinama Šar planine (Tatić, 1975; Anačkov, 2009).



Slika 2.2. Izgled cvasti lukova iz sekcije *Codonoprasum*: 1) *A. carinatum* subsp. *carinatum* (<https://www.flickr.com/photos/falkperegrin/7814094978/>), 2) *A. flavum* subsp. *flavum* (<http://botany.cz/en/allium-flavum/>), 3) *A. carinatum* subsp. *pulchellum* (http://plant-hunters.blogspot.com/2013_09_01_archive.html), 4) *A. pallens* subsp. *tenuiflorum*, 5) *A. melanantherum*, 6) *A. paniculatum* subsp. *marginatum* (foto: dr Goran Anačkov)

2.2.1.4 *Allium paniculatum* L. 1759 subsp. *marginatum* (Janka) Soó 1972

Vrsta *A. paniculatum* L. se na području Srbije javlja sporadično, sa dve podvrste: subsp. *paniculatum* i subsp. *marginatum*. Ove dve podvrste su jasno diferencirane, pa postoji tendencija da se subsp. *marginatum* proglasi za posebnu vrstu (Anačkov, 2009). U Panonskoj niziji, naročito u podunavskim predelima, prisutna je pontsko-južnosibirska podvrsta subsp. *marginatum* (Janka) Soó 1972, koja naseljava svetle hrastove šumarke i šibljake i stepske padine (Anačkov, 2009). Ova podvrsta je višegodišnja biljka, 20–60 cm visoka (Slika 2.2.). Lukovica je jajasta, pojedinačna, obavijena bledom ili mrkom izdeljenom tunikom. Stablo je okruglo ili ponekad fino brazdasto, do sredine ili i više obuhvaćeno lisnim osnovama. Lišće je linearno, do 2 mm široko, na vrhu žljebovito, kraće od stabla, samo su gornji listovi nešto duži od stabla. Po obodu lista je tanka providna margina, po kojoj je takson i dobio ime. Spata je dvolisna, zelena, trajna, izvučena vrhom u šiljak, do dva puta duža od cvasti. Cvast je monocvetna. Cvetne drške su nejednake dužine (10–35 mm), pri osnovi sa pripercima, za vreme cvetanja oborene naniže, a sa plodovima uspravljene. Perigon je 5–6 mm dugačak, listići perigona su lopatičasti ili jajasti, vrhom tupi ili koso odsećeni, beli ili bledo roze sa izraženom tamno crvenom prugom. Prašnički konci su jednake dužine sa listićima perigona ili nešto kraći, šilasti, pri osnovi prošireni, međusobno i sa listićima perigona srasli. Stubić je u početku kratak, kasnije nadvišava perigon (Tatić, 1975). Podvrstu *A. paniculatum* subsp. *marginatum* karakteriše nekoliko važnih karaktera koji je jasno odvajaju od tipične vrste. Radi se o biljci znatno manjeg habitusa, sa izraženom providnom marginom na obodu lista, građenom od jednog ili dva sloja ćelija. Pored toga, ova podvrsta ima cvetove sa drugačijom kolornom strukturom, u pitanju su beli ili svetlo roze cvetovi sa naglašenim tamnijim nervima na perigonalnim listićima (Dostál, 1989). Pored lokaliteta u Panonskoj niziji, podvrsta subsp. *marginatum* javlja se i na kserofilnim livadama šumske zone Centralne Evrope (Slovačka, Mađarska) (Govartes, 2006). U Srbiji je prisutna jedino u okolini Titela na stepskim padinama i na području Subotičke peščare (Anačkov, 2009).

2.2.1.5 *Allium pallens* L. 1762 subsp. *tenuiflorum* (Ten.) Stearn 1978 (*A. tenuiflorum* Ten. 1811)

Takson *A. pallens* subsp. *tenuiflorum* je višegodišnja biljka, 15–30 cm visoka (Slika 2.2.). Lukovica je jajasta obavijena mrkom, izbrazdanom tunikom. Stablo je okruglo i povijeno. Lišće je uzanolinearno, 0,5–1 mm široko, polukružno, žljebovito ili pri vrhu ravno. Spata je dvolisna, pri osnovi lancetasta, jedan deo od cvasti kraći, drugi duplo duži (Tatić, 1975). Cvast je kompaktna sa kratkim cvetnim drškama (Anačkov, 2009). Perigon je 5–6 mm dugačak. Listići perigona su bledocrvenkasti ili beli, jajastolancetasti i kratko zašiljeni. Prašnici su kraći od listića perigona. Raste po stenama i kamenjarima u Italiji i na Balkanskom poluostrvu. U Srbiji je veoma retka (Tatić, 1975). Jedno od potvrđenih nalazišta je klisura Belog Rzava na Mokroj Gori (Anačkov, 2009).

2.2.1.6 *Allium oleraceum* L. 1753.

Višegodišnja biljka, 30-100 cm visoka (Slika 2.3.). Lukovica je jajasta, prečnika do 1 cm, sa beličastim ili mrkim omotačem, većinom sa jednom ili više bočnih lukovica. Stablo je uspravno i tanko, samo u donjem delu sa lišćem. Lišće je sivozeleno, cevasto do skoro ravno, do 5 mm široko. Spata je dvolisna, jedna od njih je dugačka, zašiljena, trajna, kožasta i pri osnovi proširena. Cvast je rastresita, malo do mnogocvetna, loptasta ili izdužena, sa tamnocrvenim rasplodnim lukovicama. Cvetne drške su nejednake dužine, 2 do više puta duže od listića perigona, koje su za vreme cvetanja oborene naniže. Listići perigona su duguljasto lancetasti, 5–7 mm dugački, zatupasti ili zašiljeni, na vrhu sa bodljom, sa zelenim ili purpurnocrvenim glavnim nervom. Prašnici su prosti i jednake dužine sa listićima perigona, međusobno i sa listićima perigona srasli. Raste u listopadnim

šumama, livadama i kamenjarima skoro čitave Evrope izuzev severnih delova Sibira (Tatić, 1975), dok se u Srbiji javlja uglavnom na lokalitetima sa šumskom vegetacijom ili vegetacijom šibljaka (Anačkov, 2009).

2.2.1.7 *Allium fuscum* Waldst. et Kit. 1807

Vrsta *A. fuscum* Waldst. et Kit. 1807 u Srbiji postoji u dva varijeteta: tipičan varijetet *A. fuscum* Waldst. et Kit 1807 var. *fuscum* i novi varijetet *A. fuscum* Waldst. et Kit 1807 var. *gracile* Anačkov 2009.

Tipičan varijetet je višegodišnja biljka, 30-50 cm visoka (Slika 2.3.). Lukovica je jajasta sa mrkom tunikom. Stablo je okruglo, do polovine lisnato. Lišće je linearno, sivo, donje ravno, 2-4 mm široko, sa leđnim rebrom, rebro čitavom dužinom ili barem pri vrhu hrapavo, gornje uzanolinearno, ravno. Spata je dvolisna, pri osnovi proširena, vrhom u šiljak izvučena, 2-4 puta duža od cvasti. Cvast je monocvetna, rastresita. Cvetne drške su nejednake dužine, 2-8 puta duže od cvetova. Perigon je 2-6 mm dugačak. Listići perigona su na vrhu zatupasti ili zašiljeni, crvenkastmrki, na vrhu mrki. Prašnički konci su jednake dužine kao listići perigona ili kraći. Staništa ove vrste su uglavnom krečnjačke stene i kamenjari. Rasprostranjena je u Rumuniji i Srbiji, gde je uglavnom nalažena na području zapadne Srbije (Zaovine, Tara), u okolini Jagodine i u Banatu (Tatić, 1975), kao i u okolini Niša, Leskovca, Đerdapskoj klisuri, području centralne Srbije i Homoljskim planinama (Anačkov, 2009).

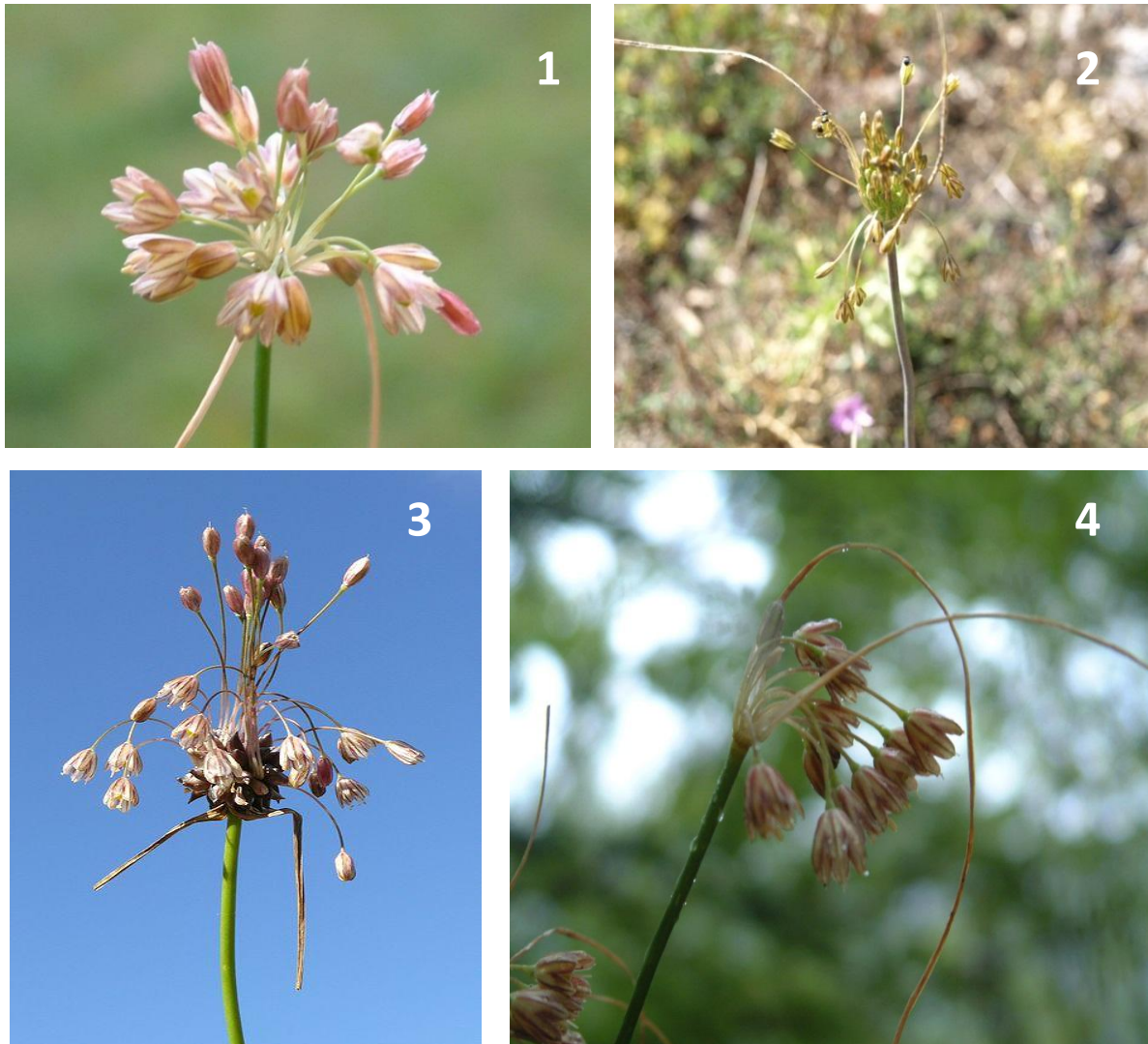
Novi varijetet *A. fuscum* Waldst. et Kit 1807 var. *gracile* Anačkov 2009 (Slika 2.3.) se razlikuje od tipičnog po opštoj građi habitusa, znatno nežnijoj konstrukciji i ređim cvetovima manjih dimenzija koji na dugačkim cvetnim drškama formiraju rastresitu cvast (Anačkov, 2009).

2.2.1.8 *Allium rhodopeum* Velen. 1890 (*Allium paniculatum* L. subsp. *villosulum* (Halácsy) Stearn)

Vrsta *A. rhodopeum* Velen. (Slika 2.3.) je mediteransko-submediteranska vrsta, koja je izdvojena iz kompleksa *A. paniculatum*, zbog toga što su joj listovi dlakavi (Anačkov, 2009). Lukovica je jednostavna, jajasta, 1,5–2,2×1–1,5 mm, sa prugastim omotačem, bez bulbila. Spoljašnja tunika je kožasta, svetlo braon, a unutrašnja belicasta, nalik membrani. Stablo je zaobljeno, do 35 cm visoko, glatko, kruto, uspravno, prečnika 1-3,5 mm, obloženo lišćem do 1/2–1/3 svoje visine. Lišće je semicilindrično 10–30 cm dugačko, prekriveno gustim dlakama 0,3–0,8 mm dužine. Cvast je zbijena, sa 10–35 cvetova na nejednakim, 5–25 mm dugačkim drškama. Spata je dvolisna. Perigon je zvonast, a listići perigona duguljasti, 5–6 mm dugački i 2–2,7 mm široki, braonkasto-zeleni mestimično ljubičasti, zaobljeni i blago zašiljeni na vrhu, sa brojnim dlakama na gornjoj polovini zadnje strane.

Prašnički konci su dugački koliko i listići perigona ili nešto kraći, beli u gornjem delu a ljubičasti u donjem, sa duguljastim žućkasto-belim anterama, nazubljeni, međusobno i sa listićima perigona srasli. Plodnik je zelenkast, 2,5–3 mm dugačak (Hayek, 1933; Brullo i drugi, 1998). Ova vrsta je balkanski endemit, raste na suvim termofilnim krečnjačkim terenima u Bugarskoj i Grčkoj (Govartes, 2006). Dlake (epidermalni trihomi) su se razvile kao adaptacija na sušna staništa. U

Srbiji je za sada konstatovana samo na jednom lokalitetu na Staroj planini u okolini Dimitrovgrada (Anačkov, 2009).



Slika 2.3. Izgled cvasti lukova iz sekcije *Codonoprasmus*: 1) *A. fuscum* var. *fuscum*, 2) *A. rhodopeum*, 3) *A. oleraceum*, 4) *A. fuscum* var. *gracile* (foto: dr Goran Anačkov)

2.2.2 Sekcija *Allium*

Tipična sekcija *Allium* (syn. Sect. *Alliotypus* Dumort., Sect. *Porrum* Miller) (Stearn, 1980) obuhvata 115 vrsta (Mathew, 1996), od kojih u Evropi raste 30 (Stearn, 1978; 1980). Na području Srbije konstatovano je šest autohtonih vrsta (Anačkov, 2009) i gajena vrsta *A. sativum* L. (Anačkov, 2003), koja je u ovom radu korišćena za poređenje rezultata u pojedinim testovima.

2.2.2.1 *Allium sativum* L. 1753

Vrsta *A. sativum* L. (beli luk) je višegodišnja biljka, 25–90 cm visoka (Slika 2.4.). Lukovica je složena, jajasta i sastavljena od 7–30 primarnih lukovica (čena) obavijenih opnastom, beličastom ili zelenkastom tunikom.

Bočne lukovice (čenovi) su ovalnojajasti, 2,5–4 cm dugi i obavijeni belom, crvenkastom ili ljubičastom ljuspom. Stablo je uspravno, do polovine listnato. Lišće je širokolinearno, ravno, obodom hrapavo do 12 mm široko, na licu žljebovito, naličju rebrasto i zašiljeno. Spata je jednodelna, vrlo duga, pri osnovi proširena, vrhom izvučena u dugačak šiljak, cela opada. Cvast se sastoji iz malog broja cvetova sa mnogobrojnim do 1 cm krupnim rasplodnim lukovicama. Cvetovi su na dugačkim drškama. Listići perigona su crvenkastobeli ili zelenkasti, 3 mm dugački. Prašnici su kraći od listića perigona. Unutrašnji prašnici pri osnovi su prošireni, sa strana sa po jednim kratkim zubićem. Ova biljka gaji se u čitavom svetu, a postojbina joj je srednja Azija (Tatić, 1975).



Slika 2.4. Izgled cvasti *A. sativum* L.
(<http://luirig.altervista.org/cpm/albums/leo-m1/leo-mic-Allium-sativum-1764.jpg>)

2.2.3 Sekcija *Cepa* (Mill.) Prokh.

Sekcija *Cepa* pripada podrodu *Cepa*, koji obuhvata 30-tak vrsta, raspoređenih u pet sekcija (Friesen i drugi, 2006). Nekoliko vrsta iz sect. *Cepa* i sect. *Schoenoprasum* su široko rasprostranjene na području Evroazije (Fritsch i Friesen, 2002). U sekciju *Cepa* ubraja se 11 vrsta – 9 autohtonih i dve ekonomski veoma važne gajene vrste: *A. cepa* L. i *A. fistulosum* L (Gurushidze i drugi, 2007). Pripadnici sekcije *Cepa* koriste se kao začinske, lekovite ili jestive biljke.

2.2.3.1 *Allium cepa* L.

Vrsta *Allium cepa* L. (Slika 2.5.) je višegodišnja biljka visine 60–120 cm, spljoštene, spljošteno ovalne ili ovalno duguljaste lukovice, čija veličina varira u zavisnosti od sorte. Lukovica je obavijena crnomrkom tunikom, sa ili bez bočnih lukovica. Stablo i lišće joj je sivoplavičasto, stablo je ispod polovine obično prošireno, trbušasto neduveno, šuplje. Spata je dvolisna do četvorolisna. Vrlo krupna cvast, sa ili bez rasplodnih lukovica. Cvetne drške su do 3 cm dugačke, mnogo duže (do 8 puta) od cvetova. Listići perigona su duguljasti, tupi, zelenkastobeli. Prašnici skoro duplo duži od listića perigona, međusobno pri osnovi i sa listićima perigona srasli pri osnovi, dok su unutrašnji pri osnovi izrazito prošireni, sa strane sa po dva uočljiva zupca, ređe bez njih ili sa slabo razvijenim zupcima. Stubić neznatno viri iznad listića perigona. Plod je skoro loptast, širok. Seme je crno, naborano, po površini sa tri rebra (Tatić, 1975). Pretpostavlja se da *A. cepa* L. vodi poreklo iz regiona koji se nalazi između reka Eufrata i Tigra (Sussenguth, 1939), danas nije poznata u divljem stanju, ali se gaji u čitavom svetu, naročito u umerenoj klimi (Breu, 1996). Srodne vrste rastu na planinama srednje Azije (Tatić, 1975).



Slika 2.5. Izgled cvasti *A. cepa* L.
(http://jcautran.free.fr/archives_familiales/loisirs/fleurs_de_mon_jardin/allium_cepa.jpg)

2.3 HEMIJSKI SASTAV VRSTA RODA *ALLIUM*

Od svih predstavnika roda *Allium*, detaljno su fitohemijski ispitane samo najpoznatije gajene vrste: *A. sativum* L. (beli luk), *A. cepa* L. (crni luk), *A. schoenoprasum* L. (vlašac) i *A. porrum* L. (praziluk). Literaturni podaci o hemijskom sastavu ostalih vrsta ovog roda su veoma oskudni, dok o predstavnicima sekcije *Codonoprasum* gotovo da uopšte nema podataka.

Beli i crni luk sadrže veliki broj različitih klasa primarnih i sekundarnih biomolekula, od kojih su, prema većini autora, najvažnija organosumporna jedinjenja (Brewster i Rabinowich, 1990; WHO, 1999; Lanzotti, 2006; Zhu i drugi, 2012). Ova jedinjenja odgovorna su za karakterističan miris i ukus lukova, kao i za većinu njihovih bioloških aktivnosti. Pored sumpornih jedinjenja, za biološku aktivnost lukova najznačajnija su fenolna jedinjenja (flavonoidi, antocijani i fenolne kiseline) (Lachman i drugi, 2003; Fossen i drugi, 1996) i steroidni saponozidi (Lanzotti, 2006). Nutritivnoj vrednosti belog i crnog luka najviše doprinose ugljeni hidrati, uglavnom fruktani (Fritsch i Friesen, 2002), glukoza, arabinoza i inulin (Vulinović-Zlatan, 2004), slobodne esencijalne aminokiseline (najzastupljenije arginin, glutamin, glutaminska kiselina) (Lee i Harnly, 2005; Hansen, 2001), vitamini (beli luk – vitamini A, B1, B2, B3, β -karoten, crni luk – vitamini A, C, B6, folat), i minerali (P, Ca, K, Mg, Zn, Mn, Na, Fe, Br, J, Se i Cu, Ge i Mo) (Christensen i drugi, 1968; Brewster i Rabinowich, 1990).

2.3.1 Organosumporna jedinjenja

Sumpor se u crnom luku, kao i ostalim vrstama roda *Allium*, nalazi vezan u različitim jedinjenjima kao što su *S*-alk(en)il-L-cistein sulfoksidi (ACSO), sulfidi, alkilpolisulfidi i aminokiseline (WHO, 1999). Fitohemijskim analizama utvrđeno je da sastav i količina sumpornih jedinjenja variraju u zavisnosti od biljnog organa, faze ontogenetskog razvoja biljke, kao i uslova skladištenja (Block, 2009).

Prva sumporna jedinjenja iz belog i crnog luka izolovana su sredinom 19. veka (Wertheim, 1844; Semmler, 1892), dok su intenzivnija istraživanja prirode i porekla ovih jedinjenja počela 40-tih godina prošlog veka. Tada je otkriveno da su isparljiva sumporna jedinjenja jakog mirisa ustvari sekundarni produkti, koji nastaju enzimskim cepanjem relativno stabilnih prekursora, tek nakon oštećenja intaktne ćelije luka. Prvi izolovani prekursor arome bio je aliin ili (+)-*S*-alil-L-cistein sulfoksid – bezmirisno jedinjenje rastvoreno u citoplazmi neoštećene ćelije belog luka (Stoll i Seebeck, 1947). Usledila su intenzivna istraživanja ovih jedinjenja, što je rezultovalo velikim brojem radova (Whitaker, 1976; Block, 1992).

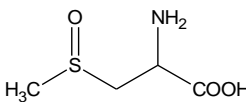
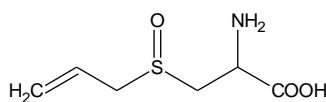
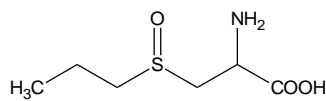
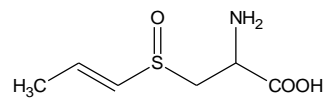
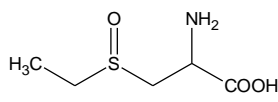
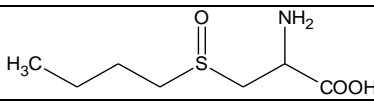
Pored aliina, u vrstama roda *Allium* do sada su identifikovana još tri dominantna ACSO: metiin, propiin i izoalliin, i dva ACSO koja se ređe javljaju: etiin i butiin (Randle i Lancaster, 2002; Rose i drugi, 2005) (Tabela 2.2.). Zastupljenost prekursora ACSO je različita kod belog i crnog luka. Dok je kod belog luka najzastupljeniji aliin, a prate ga izoalliin i metiin u maloj koncentraciji i propiin u tragovima, kod crnog luka je dominantan izoalliin, dok su metiin i aliin prisutni u znatno manjim količinama, a propiin u tragovima (Hughes i drugi, 2005).

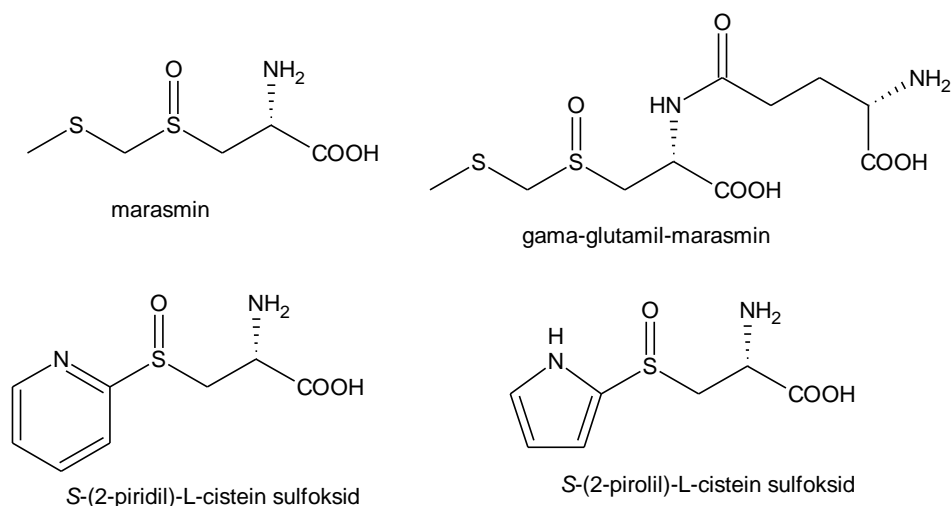
Kod nekih predstavnika podroda *Melanocrommyum* roda *Allium*, pored uobičajenih cistein sulfoksida – metiina i propiina, dokazano je i prisustvo specifičnih ACSO, kao što su marasmin, γ -glutamyl-marasmin, *S*-(2-pirolil)-cistein sulfoksid i *S*-(2-piridil)-cistein sulfoksid (Slika 2.6.) (Kusterer i drugi, 2011).

U do sada ispitivanim vrstama sekcije *Codonoprasum* (*A. carinatum*, *A. oleraceum*, *A. flavum*, *A. rupestre*, *A. karsianum*, *A. pseudoflavum*) utvrđeno je da se ukupni sadržaj cistein sulfoksida (izraženo na svež biljni materijal) kretao od 0,04 (*A. rupestre*) do 1,37% (*A. flavum*) i da je dominantni ACSO metiin. Kod vrste *A. flavum* pored metiina (relativni udeo 75%), detektovan je i *S*-(2-piridil)-*L*-cistein sulfoksid (Slika 2.6.) sa relativnom udelom od 25%. U vrstama *A. rupestre* i *A. carinatum* je kao drugi cistein sulfoksid pronađen izoaliin (12 i 18%, respektivno), dok je *A. pseudoflavum*, pored metiina sadržao marasmin (Kusterer i drugi, 2010). U *A. oleraceum* su pored metiina (89%) nađene i male količine izoaliina (7%) i aliina (3%) (Fritsch i Keusgen, 2006).

Utvrđeno je da unutar iste vrste postoje određene varijacije u koncentraciji cistein sulfoksida (Keusgen i drugi, 2002), međutim prisustvo i relativan odnos ovih jedinjenja karakteristični su za datu vrstu, mada podležu ontogenetskim promenama (Schmitt i drugi, 2005).

Tabela 2.2. Zastupljenost *S*-alk(en)il cistein sulfoksida u vrstama roda *Allium* (Fritsch i Keusgen, 2006; Rose i drugi, 2005; Kusterer i drugi, 2010)

Trivijalan naziv	Hemijski naziv	Struktura	Ime vrste
Metiin	(+)- <i>S</i> -metil- <i>L</i> -cistein sulfoksid		<i>A. cepa</i> L. <i>A. sativum</i> L. <i>A. chinense</i> G. Don <i>A. longicuspis</i> Rgl. <i>A. oleraceum</i> L. <i>A. carinatum</i> L. <i>A. flavum</i> L. <i>A. ampeloprasum</i> L. <i>A. vineale</i> L.
Aliin	(+)- <i>S</i> -alil- <i>L</i> -cistein sulfoksida		<i>A. sativum</i> L. <i>A. ursinum</i> L. <i>A. ampeloprasum</i> L. <i>A. longicuspis</i> Rgl. <i>A. vineale</i> L.
Propiin	(+)- <i>S</i> -propil- <i>L</i> -cistein sulfoksid		<i>A. cepa</i> L. <i>A. porrum</i> L. <i>A. altaicum</i> Pall. <i>A. fistulosum</i> L. <i>A. ampeloprasum</i> L.
Izoaliin	(+)- <i>S</i> - <i>trans</i> -(1-propenil)- <i>L</i> -cistein sulfoksid		<i>A. cepa</i> L. <i>A. nutans</i> L. <i>A. ascalonicum</i> auct. <i>A. schoenoprasum</i> L. <i>A. oleraceum</i> L. <i>A. carinatum</i> L. <i>A. ampeloprasum</i> L. <i>A. vineale</i> L.
Etiin	(+)- <i>S</i> -etil- <i>L</i> -cistein sulfoksid		<i>A. aflatumense</i> B. Fedt. <i>A. ampeloprasum</i> L. <i>A. ochotense</i> Prokh. <i>A. victoralis</i> L.
Butiin	(+)- <i>S</i> - <i>n</i> -butil- <i>L</i> -cistein sulfoksid		<i>A. cepa</i> var. <i>tropeana</i>



Slika 2.6. Cistein sulfoksidi karakteristični za podrod *Melanocrommyum* roda *Allium*

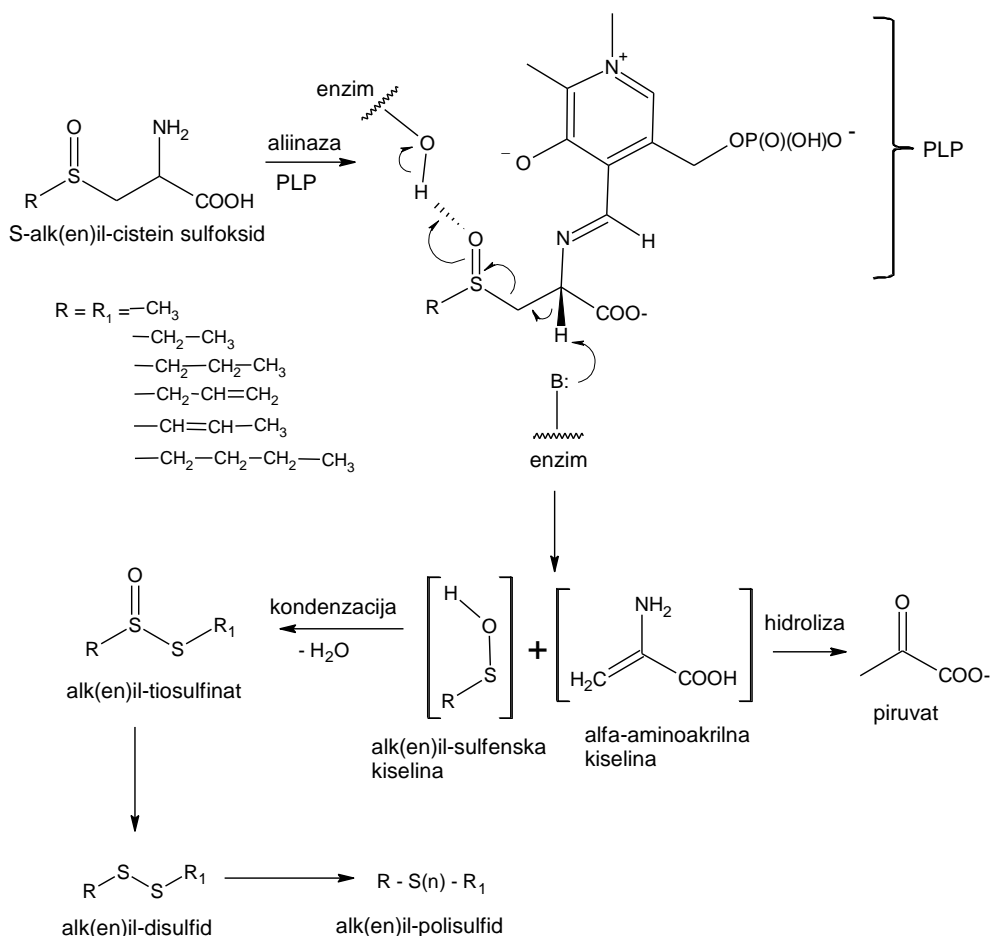
Narušavanjem ćelijske strukture (npr. gnječenjem, seckanjem ili žvakanjem), iz vakuola se oslobađa enzim aliinaza (Goryachenkova, 1952), koji razlaže ACSO na pirogroždanu kiselinu, amonijak i alk(en)il-sulfensku kiselinu (Slika 2.7.). Aliinaza je glikoprotein (~50 kDa) sa piridoksal-5'-fosfatom kao prostetičnom grupom. Prisustvo aliinaze (sinonimi: aliin alkil-sulfonatlijaza, alkil Cys sulfoksid lijaza) zajedničko je za sve vrste roda *Allium* (Brewster i Rabinowich, 1990; Rose i drugi, 2005), s tim da aliinaze iz različitih vrsta mogu imati različitu specifičnost, pH optimum, Km i molekulsku strukturu. Krest i saradnici (2002) su sprovedli opsežna istraživanja enzima aliinaze kod devet vrsta roda *Allium* (*A. sativum*, *A. sphaerocephalon* L., *A. victorialis* L., *A. hymenorrhizum* Ledeb, *A. saxatile* M. Bieb, *A. obliquum* L., *A. subhirsutum* L., *A. jesdianum* i *A. stipitatum* Reg) i odredili pH optimum (~7,5) i temperaturni optimum (od 36 do 48 °C) aliinaze. Takođe je dokazano da između aliinaza izolovanih iz *A. sativum*, *A. cepa* i *A. ascalonicum* postoji velika sličnost u sekvenci aminokiselina (Van Damme i drugi, 1992). Iz vrste *A. cepa* izolovane su dve izoforme aliinaze (sa različitom molekulskom strukturom), koje su aktivne kao monomeri, a takođe i kao trimeri i tetrameri (Lancaster i drugi, 2000).

Aktivnost aliinaze, koja se koristi i kao parametar jačine arome luka, najčešće se određuje merenjem koncentracije produkata reakcije katalizovane ovim enzimom, i to prvenstveno piruvata (Brewster i Rabinowich, 1990; Randle i Bussard, 1993). Piruvat je pogodan zato što nastaje u reakciji razlaganja svakog prekursora arome, i to u odnosu 1:1, i stabilno je jedinjenje.

Rakcija katalizovana alinazom odvija se mehanizmom β -eliminacije *S*-alk(en)il-sulfoksidne grupe iz supstrata. Oba produkta reakcije su hemijski nestabilna: ketimin podleže spontanog hidrolizi do piruvata i amonijaka, dok se alk(en)il-sulfenska kiselina kombinuje sa još nekim koreaktantom, najčešće sa još jednim iste vrste, gradeći tiosulfinate (Slika 2.7.).

Nastali tiosulfinati se mogu podeliti u dve grupe: 1) simetrični tiosulfinati koji nastaju kondenzacijom dva molekula sulfenske kiseline sa istom alk(en)il grupom i 2) asimetrični tiosulfinati nastali kondenzacijom dva različita molekula sulfenske kiseline. Tiosulfinati su takođe nestabilni i dalje se raspadaju na različita jedinjenja koja zapravo daju aromu lukovima. U zavisnosti od vrste luka i eksperimentalnih uslova (pH, temperatura, način pripreme uzorka, vreme skladištenja) mogu nastati različita, uglavnom isparljiva, sumporna jedinjenja (dialil, metil alil, i dietil mono-, di-, tri-, tetra-, penta- i heksasulfidi, vinilditiini, i *cis*- i *trans*-ajoen) (Slika 2.8). Mogući načini analize sumpornih jedinjenja u lukovima obuhvataju: 1) *headspace* GC-MS analizu (HS-GC/MS), koja podrazumeva analizu isparljivih jedinjenja nastalih na sobnoj temperaturi nakon seckanja biljnog tkiva, 2) HPLC analizu tiosulfinata u svežem ekstraktu, 3) GC-MS analizu

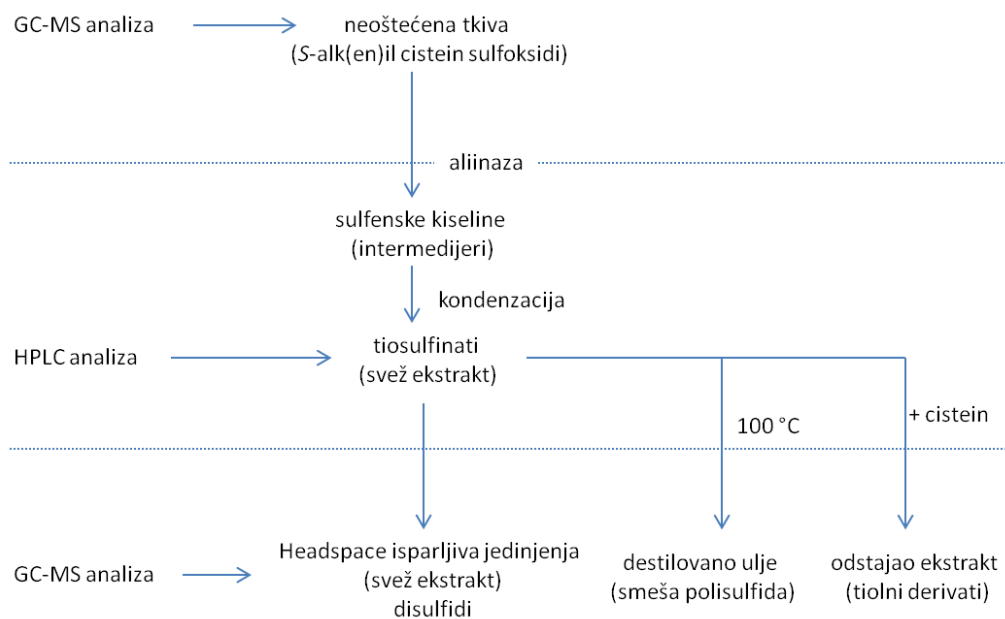
komponentata etarskog ulja dobijenog hidrodestilacijom svežeg biljnog materijala, 4) GC-MS analizu tiolnih derivata nastalih tokom stajanja ekstrakta na sobnoj temperaturi (Rose i drugi, 2005).



Slika 2.7. Pretpostavljeni mehanizam katalitičkog cepanja C-S veze u cistein sulfoksidu delovanjem aliinaze (Block, 1992; Keusgen i drugi, 2002; Shimon i drugi, 2007)

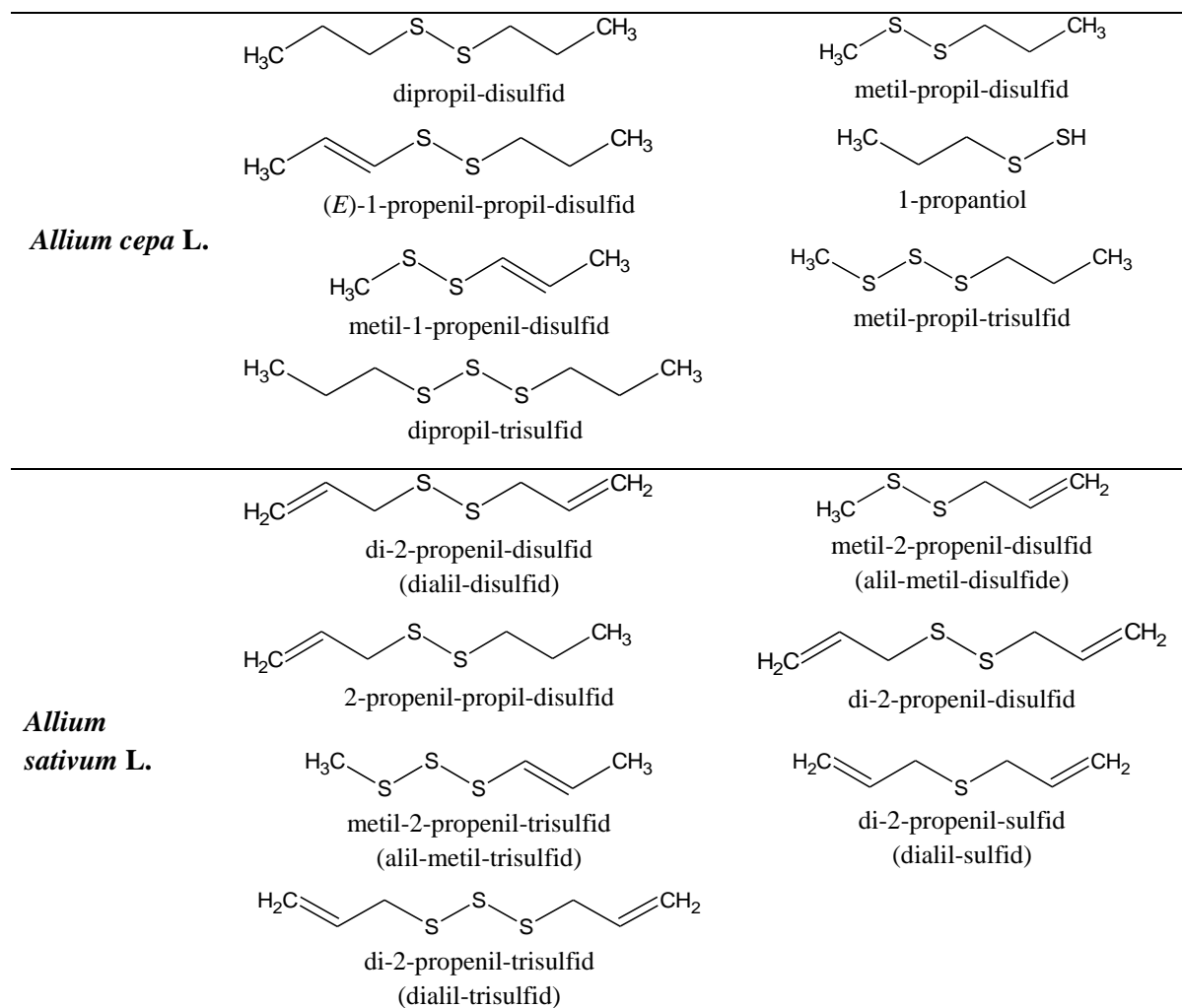
U ovom radu, analiza isparljivih jedinjenja vrsta roda *Allium* sect. *Codonoprasum* urađena je primenom *headspace* GC-MS tehnike, dok su neisparljiva sumporna jedinjenja analizirana u 70 % (v/v) metanolnim ekstraktima primenom QqQ LC-MS/MS tehnike.

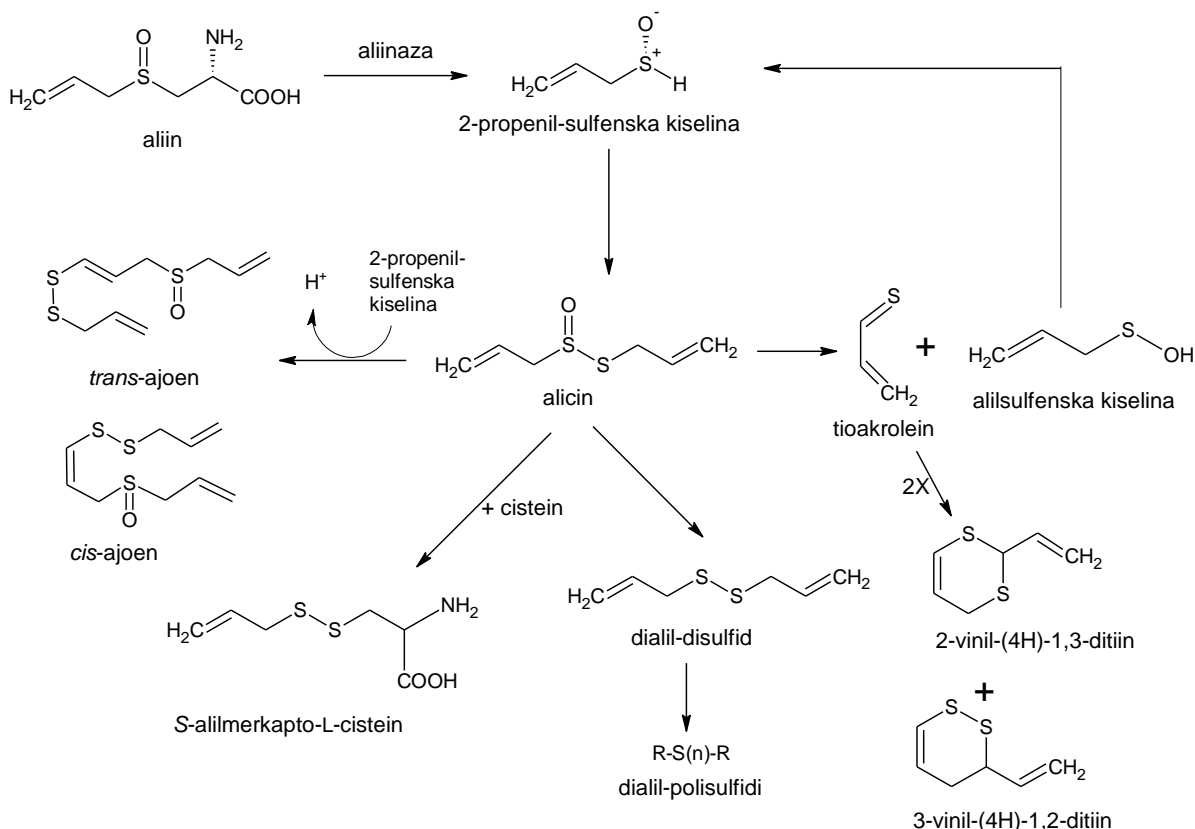
U Tabeli 2.3 prikazane su hemijske strukture tipičnih sulfida, detektovanih HS-GC/MS (*Headspace* GC-MS) analizom, koji nastaju razlaganjem alk(en)il-tiosulfinata u crnom i belom luku. U slučaju belog luka najdominantniji sulfid je dialil-disulfid. On nastaje iz alicina (dialiltiosulfinata) pod uticajem kiseonika iz vazduha, a alicin nastaje dimerizacijom dva molekula 2-propenil-sulfenske kiseline, koja je proizvod delovanja aliinaze na dominantni ACSO – aliin (*Slika 2.9.*) (Rose i drugi 2005; Kovačević, 2002). Pored sulfida, iz alicina autooksidacijom mogu da nastanu ciklični vinilditiini, a u alkoholno/vodenim rastvorima *cis*- i *trans*- ajoeni. Alicin takođe može da bude razložen na alil-sulfensku kiselinu i tioakrolein, dok u reakciji sa cisteinom može da formira *S*-alilmerkapt-L-cistein (*Slika 2.9.*). Kod crnog luka je najdominantniji dipropil-disulfid, nastao iz izoaliina (Rose i drugi, 2005).



Slika 2.8. Tehnike analize sumpornih jedinjenja u vrstama roda *Allium* (Rose i drugi, 2005)

Tabela 2.3. Dominantna sulfidna jedinjenja detektovana *headspace* GC-MS analizom u crnom i belom luku (Rose i drugi, 2005; Kallio i Salorinne, 1990; Božin, 2003; Block i drugi, 1992)





Slika 2.9. Hidroliza *S*-2-propenil-cistein sulfoksida (aliina) dejstvom aliinaze: produkcija jedinjenja odgovornih za miris i ukus belog luka (Rose i drugi, 2005)

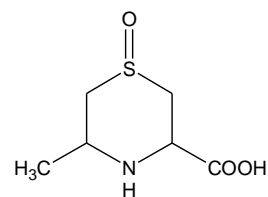
Početni metabolit za sintezu sumpornih jedinjenja u lukovima je cistein. Iz cisteina se metaboličkim reakcijama sintetišu metionin, proteini, glutation, ali i neproteinogeni derivati, u koje spadaju γ -glutamil peptidi, *S*-supstituisani cisteini i ACSO (Slika 2.10.).

γ -glutamil peptidi, za koje se pretpostavlja da svi potiču od glutaciona (γ -glutamil cisteinil glicina), obuhvataju γ -glutamil-*S*-alk(en)il-glutacione, γ -glutamil-*S*-alk(en)il-cisteine i γ -glutamil-*S*-alk(en)il-cistein sulfoksidi (Jones i drugi, 2004). γ -glutamil-*S*-supstituisani cisteini prisutni su u visokoj koncentraciji u lukovici i semenu, služe kao rezerve azota i sumpora tokom perioda mirovanja u životnom ciklusu lukova i imaju ulogu u transportu aminokiselina kroz ćelijsku membranu (Brewster i Rabinowich, 1990). Do sada su iz *Allium* vrsta izolovana ukupno 24 γ -glutamil peptida, od kojih 18 sadrži sumpor. Samo u crnom luku detektovano je 14 γ -glutamil peptida (9 sadrži sumpor) prikazanih u Tabeli 2.4. (Randle i drugi, 1995). Oni se tokom klijanja semena veoma brzo hidrolizuju delovanjem γ -glutamil-transpeptidaze, dajući ACSO (Slika 2.10.) (Rose i drugi, 2005).

Ćelije *Allium* vrsta, pored γ -glutamil-peptida i ACSO, sadrže i druga neisparljiva sumporna jedinjenja rastvorna u vodi na koje ne deluje enzim aliinaza, kao što su *S*-substituisani cisteini i cikloaliin. Tako su u ekstraktu crnog luka nađeni *S*-metil-cistein i *S*-propenil-cistein, dok je u vodenom ekstraktu belog luka prisutan *S*-alil-L-cistein (Amagase, 2006). *S*-supstituisani cisteini se veoma brzo oksiduju do odgovarajućih sulfoksida. Cikloaliin (5-metil-1,4-tiazan-3-karboksilna kiselina-1-oksidi) (Slika 2.11.) nastaje iz γ -L-glutamil-*S*-(*trans*-1-propenil)-L-cisteina delovanjem γ -glutamil-transpeptidaze i oksidaze, a takođe može da nastane i hemijskom konverzijom izoaliina tokom stajanja luka na povišenoj temperaturi (Ichikawa i drugi, 2006). S obzirom da ne podleže delovanju aliinaze, cikloaliin je stabilan tokom obrade lukova i znatno doprinosi njihovoj biološkoj aktivnosti.

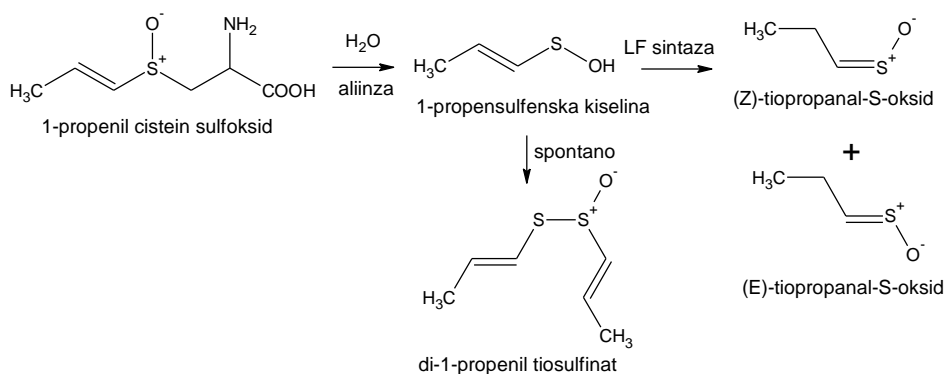
Tabela 2.4. γ -Glutamil peptidi izolovani iz vrste *Allium cepa* L.

γ -glutamil peptidi	γ -glutamil peptidi sa sumporom
γ -glutamil-valin	γ -glutamil-metionin
γ -glutamil-izoleucin	γ -glutamil-S-metil-L-cistein
γ -glutamil-leucin	γ -glutamil-S-metil-L-cistein sulfoksid
γ -glutamil-fenilalanin	γ -glutamil-S-trans-(1-propenil)-L-cistein sulfoksid
γ -glutamil-tirozin	γ -glutamil-S-(2-karboksipropil)-L-cistein sulfoksid
	glutation
	glutation- γ -glutamil-cistein-disulfid
	glutation-cistein-disulfid
	S-sulfoglutation

**Slika 2.11.** Hemijmska struktura cikloaliina

Crni luk, pored aliinaze, sadži i enzim sintazu lakrimatornog faktora (LF sintaza – *lachrymatory factor synthase*), koji je odgovoran za suzni efekat ovog luka. Izoaliin, dominantni ACSO u ovoj vrsti, se pod dejstvom aliinaze razlaže na 1-propenil sulfensku kiselinu, koja se u prisustvu LF sintaze prevodi u smešu (*Z*)- i (*E*)-tiopropanal-S-oksida u odnosu 19:1, što dovodi do specifične pojave suzenja očiju (*Slika 2.12.*) (Brodnitz i Pascale, 1971; Imai i drugi 2002). Već nakon 30 min, tiopropanal-S-oxid se prevodi u diprop(en)il disulfide (Järvenpää i drugi, 1998).

Smatra se da cistein sulfoksidi u kombinaciji sa enzimom aliinazom imaju ulogu u hemijskoj zaštiti lukova od herbivora, a s obzirom da pokazuju antibakterijsku i antifungalnu aktivnost, može se pretpostaviti da učestvuju i u odbrani biljke od mikroorganizama (Keusgen, 2002).

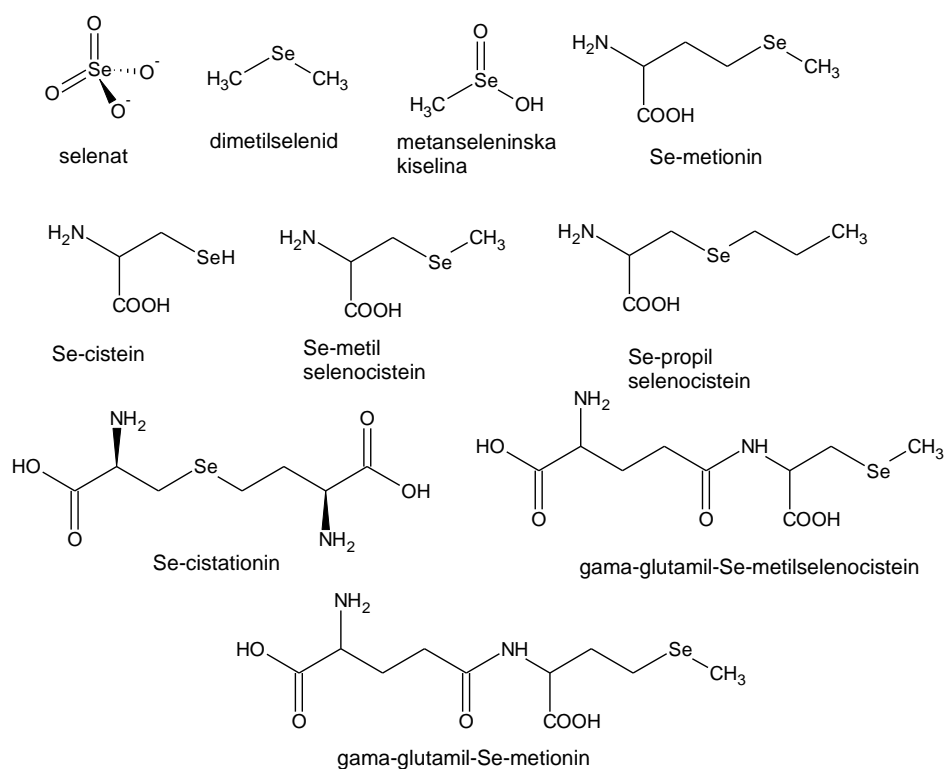
**Slika 2.12.** Sinteza lakrimatornog faktora kod crnog luka (Rose i drugi, 2005)

2.3.2 Organoselenova jedinjenja

Lukovi imaju sposobnost da apsorbuju selen iz zemljišta u obliku selenita sa Se(IV) ili Se(VI) i akumuliraju ga u koncentraciji većoj od 1000 ppm. Sumpor i selen su hemijski veoma slični i zbog toga Se može lako da zameni S u metabolizmu biljke i da se inkorporira u različita jedinjenja umesto sumpora. Beli luk ima znatno veću sposobnost akumulacije Se u odnosu na crni luk. U lukovici belog i crnog luka i *A. fistulosum* identifikovani su mnogi analozi S-alk(en)il-cisteina i γ -glutamil-alk(en)il-cistein peptida (*Slika 2.13.*), od kojih su najzastupljeniji γ -glutamil-Se-metil selenocistein, selenometionin i Se-metil selenocistein. Za ova jedinjenja dokazano je da su mnogo bolji antikancer agensi (aktiviraju enzime za detoksifikaciju kancerogena i sprčavaju tumorogenezu) nego odgovarajući S-analozi, zbog čega je interes za njihovo istraživanje naglo

porastao (Block i drugi, 2001; Whanger, 2004; Arnault i Auger, 2006). Tako je za dialil-selenid dokazano da pokazuje oko 300 puta veću sposobnost redukcije tumora dojke od dialilsulfida (El-Bayoumi i drugi, 1996). Takođe, *Se* je esencijalni mikroelement za čoveka jer ulazi u sastav nekih enzima (prvenstveno enzima antioksidantne zaštite) i njegov nedostatak u ishrani dovodi do različitih bolesti (Narajji i drugi, 2007). S obzirom da organski vezan *Se* ima daleko veću biološku raspoloživost i veoma često manju toksičnost od neorganskih formi selena, prisustvo organoselenovih jedinjenja u lukovima značajno doprinosi njihovoj nutritivnoj vrednosti.

Analiza organo-*Se* jedinjenja u biološkim uzorcima nije jednostavna, prvenstveno zbog nedostatka komercijalnih standarda. Zbog toga se koriste specifične instrumentalne tehnike, kao što su gasna hromatografija sa atomskim emisionim detektorom (GC–AED) nakon derivatizacije sa piridinom i etil-hloroformatom, zatim hromatografija sa induktivno spregnutom plazmom kao jonskim izvorom i visoko-senzitivnim masenim detektorom (HPLC–ICP–MS) i tečna hromatografija sa APCI jonskim izvorom („Atmospheric Pressure Chemical Ionization”) i MS–MS detektorom (HPLC–APCI–MS–MS) (Arnault i Auger, 2006).



Slika 2.13. Strukture organo-*Se* jedinjenja izolovanih iz *A. cepa*, *A. sativum* i *A. fistulosum* (Shah i drugi, 2004; Arnault i Auger, 2006)

2.3.3 Fenolna jedinjenja

Fenolna jedinjenja predstavljaju drugu značajnu klasu sekundarnih biomolekula crnog i belog luka, ali i ostalih vrsta roda *Allium*.

Ovu najbrojniju klasu sekundarnih biomolekula biljaka, sa više od 8000 do sada poznatih struktura, karakteriše prisustvo jednog ili više aromatičnih prstenova sa jednom ili više hidroksilnih grupa. Prema složenosti podeljeni su na proste i složene, a najrasprostranjeniji su flavonoidi, fenilpropanoidi i fenolne kiseline. Većina ovih jedinjenja se u biljkama javlja u formi glikozida, sa jednom ili više šećernih komponenti, što povećava njihovu rastvorljivost u vodi. Fenolne kiseline obuhvataju sva jedinjenja koja sadrže najmanje jednu fenolnu i jednu karboksilnu grupu, pri čemu su u okviru ove grupe u prirodi najrasprostranjeniji derivati benzoeve i cimetne kiseline. Ova jedinjenja nastaju iz fenilalanina ili L-tirozina, biosintetskim putem preko šikimske kiseline. Karboksilna funkcija je često u obliku estra ili depsida, a fenolne hidroksilne grupe mogu biti slobodne, glikozilovane ili metoksilovane. Fenilpropanoidi u višim biljkama učestvuju u rastu i razvoju biljke, mehaničkoj potpori, mehanizmima odbrane od bolesti i štite biljku od biotičkih i abiotičkih stresogenih faktora (Solecka, 1997).

Flavonoidi sadrže više fenolnih hidroksilnih grupa vezanih za difenilpropanski ($C_6-C_3-C_6$) skelet. Prema stepenu oksidacije centralnog piranskog prstena flavonoidi su podeljeni u 12 klasa, od kojih su u biljkama najčešće zastupljeni flavoni (luteolin, apigenin), flavonoli (kvercetin, kemferol), flavan-3-oli (katehini), antocijanidini i izoflavoni (genistein). Strukturne razlike u okviru jedne klase, potiču od varijacija u broju i rasporedu hidroksilnih grupa vezanih za osnovni skelet, kao i od varijacija u stepenu i prirodi njihove alkilacije i/ili glikozilacije. Od šećera koji učestvuju u glikozilaciji najzastupljeniji su monosaharidi: glukoza, galaktoza, ramnoza, ksiloza i arabinoza, a mogu biti i disaharidi, kao npr. rutinoza. Moguće su i brojne druge modifikacije njihove osnovne strukture, kao što su metilacije hidroksilnih grupa, glikozilacije flavonoidnog jezgra (nastajanje C-glikozida), dimerizacije, vezivanje neorganskog sulfata itd (Rice-Evans i drugi, 1997). Flavonoidi se u biljkama sintetišu kao odgovor na različite ekološke i fiziološke stimulanse (UV radijacija, napad patogena ili insekata). Smatra se da je jedna od funkcija flavonoida zaštita biljaka od prekomernog zračenja. S obzirom da imaju karakterističan apsorpcioni spektar, flavonoidi daju boju cvetovima i na taj način privlače insekte i pospešuju oprašivanje, a javljaju se i kao kopigmenti u slučaju kada nisu sami po sebi obojeni. Mogu da budu citotoksični, da inhibiraju rast larvi, odbijaju herbivore, a neki se sintetišu u biljci kao odgovor na infekcije patogenih organizama, pa se svrstavaju u fitoaleksine (Dixon i Steele, 1999; Harborne i Williams, 2000). Pored toga, flavonoidi značajno doprinose hvatanju slobodnih radikala produkovanih tokom metaboličkim reakcijama u biljkama (Agati i drugi, 2012).

Hrana biljnog porekla je često veoma bogata fenolnim jedinjenjima. Ova jedinjenja sa jedne strane doprinose boji, mirisu i ukusu hrane, a s druge strane povećavaju oksidativnu stabilnost prehrambenih proizvoda (Shahidi i Wanasundara, 1992). Takođe, biljni fenoli imaju zavidan spektar farmakoloških aktivnosti. Mnoga epidemiološka istraživanja u poslednjih dvadeset godina pokazala su da ishrana bogata biljnim fenolima smanjuje rizik od određenih bolesti (Ren i drugi, 2003; Steinmetz i Potter, 1996; Law i Morris, 1998; Riboli i Norat, 2003). Ovde prvenstveno spadaju bolesti u čijoj patofiziologiji se nalazi oksidativni stres, a to su: kardiovaskularne bolesti, ateroskleroza, neurodegenerativne bolesti (Alchajmerova i Parkinsonova bolest), reumatoidni artritis, multipla skleroza, prerano starenje i kancerogena obolenja. Uloga biljnih fenola u prevenciji ovih bolesti prvobitno je pripisivana njihovoj izraženoj antioksidantnoj aktivnosti (Heim i drugi, 2002), koja je dokazana u mnogobrojnim *in vitro* testovima (Rice-Evans i drugi, 1996). Međutim, aktivnost ovih jedinjenja *in vivo* umnogome zavisi od njihove apsorpcije i biološke raspoloživosti u organizmu (Karakaya, 2004). Naime, za mnoga konjugovana polifenolna

jedinjenja dokazano je da se samo mali deo od ukupne količine unete putem hrane absorbuje u intaktnom obliku, dok se veći deo prethodno deglikozilacijom prevodi u aglikone pa tek onda apsorbuje. Nakon apsorpcije, fenolna jedinjenja dalje podležu metaboličkim reakcijama, pa se zato mora uzeti u obzir da degradacioni produkti ovih jedinjenja takođe imaju udela u biološkoj aktivnosti.

Pored antioksidantne aktivnosti, dokazano je da određena fenolna jedinjenja ispoljavaju i antiinflamatornu (Erlejman i drugi, 2008), antiproliferativnu (Haddad i drugi, 2006), antimutagenu (Steiner i drugi, 2007), antigenotoksičnu (Bhouri i drugi, 2011), estrogenu (Dixon i Ferreira, 2002), antimikrobnu (Cushnie i Lamb, 2005) antivirusnu, hepatoprotektivnu (Middleton i drugi, 2000) i antialergenu aktivnost (Kawai i drugi, 2007). Takođe, imaju sposobnost inhibicije pojedinih enzima (Middleton i drugi, 2000) i smanjuju nivo holesterola u krvi i krvni pritisak (Anderson i drugi, 1999; Kris-Etherton i drugi, 2004). Jedinjenja iz grupe biljnih fenola se smatraju netoksičnim, mada neki flavonoidi mogu delovati mutageno, ali samo pri izrazito visokim koncentracijama (Harborne, 1989). Zbog širokog spektra aktivnosti koje biljni fenoli ispoljavaju, istraživanja ovih jedinjenja su u poslednjih nekoliko decenija veoma intenzivna, i od velikog su interesa kako za prehrambenu tako i za farmaceutsku industriju.

Za ekstrakciju, identifikaciju i kvantifikaciju biljnih fenola razvijene su mnogobrojne metode u poslednji 30 godina (Khoddami i drugi, 2013). Postupak pripreme uzorka i način ekstrakcije su veoma važni koraci u njihovoj analizi. Najčešće metode ekstrakcije su maceracija, Sokslet ekstrakcija, ekstrakcija zagrevanjem uz refluks, ultrazvučna, mikrotalasna i superkritična ekstrakcija, dok se kao ekstragensi najčešće koriste voda i polarni organski rastvarači (acetan, etil acetat, alkoholi – metanol, etanol, propanol). U slučaju antocijana ekstrakcija je znatno efikasnija ako se polarni organski rastvarač blago zakiseli (Naczki i Shahidi, 2006). Za određivanje sadržaja ukupnih fenola ili pojedinačnih klasa fenola koriste se spektrofotometrijske metode, koje se zasnivaju na detekciji specifičnih strukturalnih grupa. Tako se Folin-Ciocalteu test široko primenjuje za određivanje ukupnih fenola (Singleton i drugi, 1999), a vanilinski (Price i drugi, 1978) i procijanidinski (Poter i drugi, 1985) test za određivanje ukupnih procijanidina. Spektrofotometrijska metoda za kvantitaciju ukupnih antocijana zasniva se na osobini ovih jedinjenja da pri različitim pH vrednostima menjaju boju (Lee i drugi, 2005), dok je u metodi za određivanje ukupnog sadržaja flavonoida, tanina i derivata kafene kiseline iskorišćena njihova sposobnost da kompleksiraju Al(III) (Zaporozhets i drugi, 2004). Međutim, pomenute spektrofotometrijske metode nisu dovoljno specifične, jer može doći do interferencije sa drugim supstancama prisutnim u ekstraktu kao što su proteini, nukleinske i amino kiseline. Takođe, zbog kompleksnosti strukture fenolnih jedinjenja biljaka veoma je teško pronaći odgovarajući standard za kalibraciju (Naczki i Shahidi, 2006).

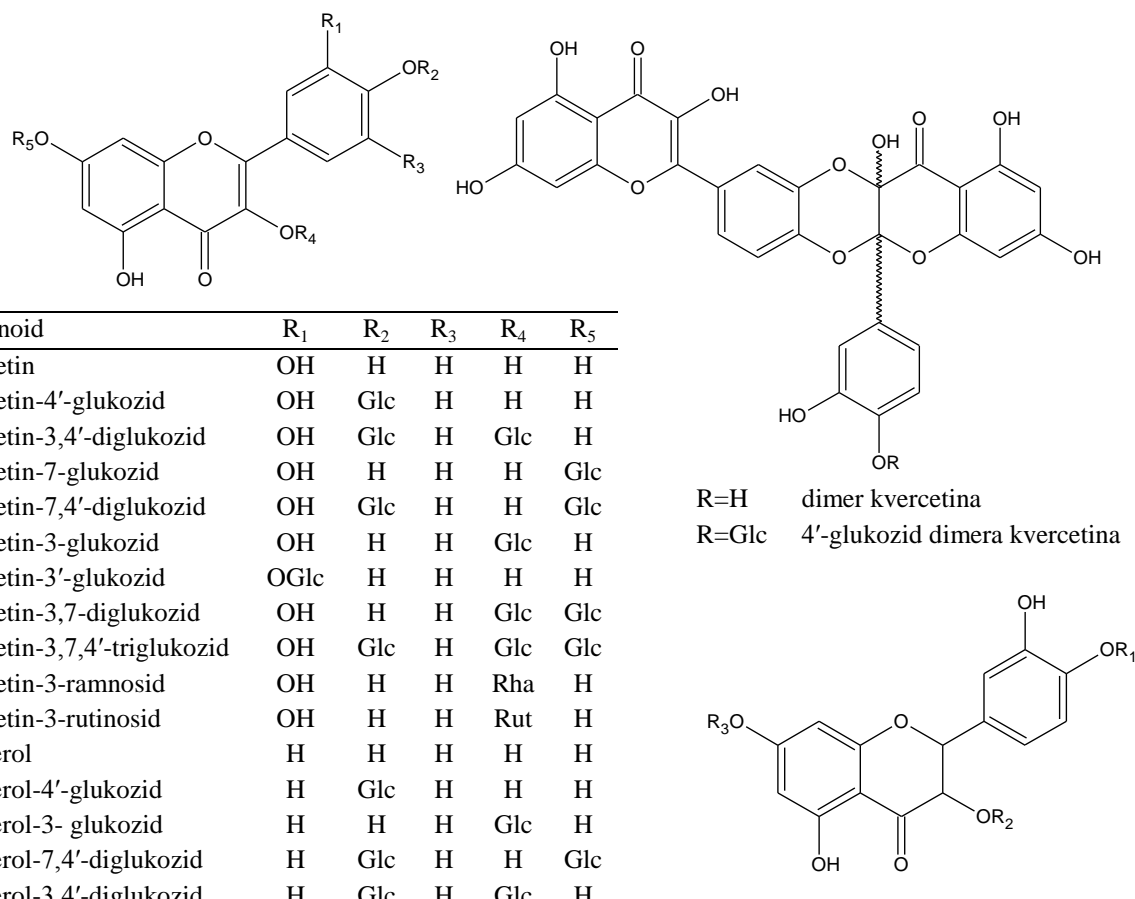
Za separaciju, preparativnu izolaciju, prečišćavanje, identifikaciju i kvantifikaciju fenolnih jedinjenja koriste se različite hromatografske tehnike (Naczki i Shahidi, 2006). Najčešće primenjivane tehnike za razdvajanje su tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) i gasna hromatografija (GC), pri čemu se za detekciju obično koriste UV–VIS i detektor s diodnim nizom ("diode-array detector" – DAD), kao i masenospektrometrijski detektor (MS), a mogu se koristiti i elektrohemijski (EC) i fluorescentni detektor (FD). Masena spektrometrija sa elektrosprej jonizacijom naročito je pogodna za strukturalnu karakterizaciju fenola. Jedna od danas najnaprednijih tehnika za razdvajanje biljnih fenola je kapilarna elektroforeza (CE), koja se zasniva na migraciji naelektrisanih analita u električnom polju. CE takođe može biti kuplovana sa elektrosprej jonizacijom i masenom spektrometrijom. Za preparativnu izolaciju čistih jedinjenja može se koristiti centrifugalna particiona hromatografija (CPC), kod koje su i stacionarna i mobilna faza u tečnom stanju, a razdvajanje komponenti se zasniva na raspodeli između dve nemešljive tečnosti

(Vitrac i drugi, 2001). Za separaciju i kvantitaciju fenolnih jedinjenja razvijene su i brojne gasno-hromatografske metode, međutim one zahtevaju dodatnu pripremu uzorka: uklanjanje lipida, kiselu, baznu ili enzimsku hidrolizu estara i glikozida fenola kako bi se oslobodili aglikoni, transformaciju u isparljivije derivate (metilacija, trifluoroacetilacija, konverzija u trimetilsilil derivate ili derivatizacija sa N-(tert-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoro-acetamidom). Modernizacijom gane hromatografije – uvođenjem visokotemperaturnih kolona i elektronskih kontrolora pritiska, znatno se povećala efikasnost razdvajanja i opseg molekulskih masa supstanci koje mogu biti analizirane pomoću GC (Naczki i Shahidi, 2006). Papirna (PC) i tankoslojna hromatografija (TLC) su danas još uvek u širokoj upotrebi za prečišćavanje i izolaciju antocijana, flavonola, kondenzovanih tanina i fenolnih kiselina (Naczki i Shahidi, 2006). Za konačnu potvrdu strukture čistih izolovanih jedinjenja najčešće se koristi NMR spektroskopija (Pinheiro i Justino, 2012).

Od biljnih fenola, u vrstama roda *Allium* najzastupljeniji su flavonoidi, i to prvenstveno flavonoli, zatim antocijani, a u nekim vrstama i flavoni. *A. cepa* je jedan od najbogatijih izvora flavonoida u ljudskoj ishrani. Sadržaj ukupnih fenola se kod različitih varijeteta *A. cepa* kreće od oko 2-3 g kg⁻¹ u lukovici do oko 80 g kg⁻¹ u ljusci lukovice crvenog luka, dok je kod belog luka sadržaj ukupnih fenola znatno manji i kreće se od oko 100 mg kg⁻¹ u čenovima do oko 300 mg kg⁻¹ u stablu (Nuutila i drugi, 2003). Sadržaj flavonoida zavisi od brojnih unutrašnjih i spoljašnjih faktora, kao što su način kultivacije, lokalitet, godina kultivacije, ontogenetska faza, uslovi skladištenja i načini prerade.

Najdominantniji flavonoidi u lukovima su glikozidi kvercetina, aglikona iz klase flavonola. Kvercetin-3,4'-O-diglukozid i kvercetin-4'-O-glukozida čine oko 85% od ukupnog sadržaja flavonoida u varijetetima crnog luka, pri čemu su zapažene značajne razlike u relativnom odnosu ova dva glikozida između različitih varijeteta. U sastav preostalih 15% ulaze druga flavonolna jedinjenja, čije su strukture date na *Slici 2.14.*, a među njima su najzastupljeniji kvercetin-3-O-glukozid, aglikon kvercetin i izoramnetin-glukozid (Price i Rhodes, 1997; Park i Lee, 1996), dok su ostala jedinjenja prisutna u minornim količinama (Bonaccorsi i drugi, 2005; Slimestad i drugi, 2007). U ljusci crvenog varijeteta *A. cepa* otkriveni su i glikozidi retkog dihidroflavonola taksifolina (Ferrerres i drugi, 1996; Fosen i drugi, 1998; Corea i drugi, 2005), kao i neka dimerna i trimerna jedinjenja kao što su dimer kvercetina i njegov glikozid (Ly i drugi, 2005) (*Slika 2.14.*).

U belom luku, za razliku od crnog luka, dominiraju slobodni flavonski aglikoni – apigenin i miricetin (Miean i Mohamed, 2001; Azzini i drugi, 2014), a nađena je i manja količina kvercetina, rutina (kvercetin 3-rutinozida) i diosmetina (luteolin 4'-metiletara) (Božin, 2009) i još manja količina kemferola (Gorinstein i drugi, 2008). Ove supstance se u daleko većoj količini nalaze u nadzemnim zelenim delovima biljke nego u lukovici. Kim i saradnici (2005) su iz listova i izdanaka belog luka izolovali kemferol 3-O-β-D-glukopiranozid (astragalina), kvercetin 3-O-β-D-ksilopiranozid (rejnoutrin), kvercetin 3-O-β-D-glukopiranozid (izokvercitrin) i izoramnetin 3-O-β-D-glukopiranozid (*Slika 2.15.*).



Flavonoid	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
kvercetin	OH	H	H	H	H
kvercetin-4'-glukozid	OH	Glc	H	H	H
kvercetin-3,4'-diglukozid	OH	Glc	H	Glc	H
kvercetin-7-glukozid	OH	H	H	H	Glc
kvercetin-7,4'-diglukozid	OH	Glc	H	H	Glc
kvercetin-3-glukozid	OH	H	H	Glc	H
kvercetin-3'-glukozid	OGlc	H	H	H	H
kvercetin-3,7-diglukozid	OH	H	H	Glc	Glc
kvercetin-3,7,4'-triglukozid	OH	Glc	H	Glc	Glc
kvercetin-3-ramnosid	OH	H	H	Rha	H
kvercetin-3-rutinosid	OH	H	H	Rut	H
kemferol	H	H	H	H	H
kemferol-4'-glukozid	H	Glc	H	H	H
kemferol-3- glukozid	H	H	H	Glc	H
kemferol-7,4'-diglukozid	H	Glc	H	H	Glc
kemferol-3,4'-diglukozid	H	Glc	H	Glc	H
izoramnetin-4'-glukozid	OCH ₃	Glc	H	H	H
izoramnetin-3-glukozid	OCH ₃	H	H	Glc	H
izoramnetin-3,4'-diglukozid	OCH ₃	Glc	H	Glc	H
izoramnetin	OCH ₃	H	H	H	H
miricetin	OH	H	OH	H	H

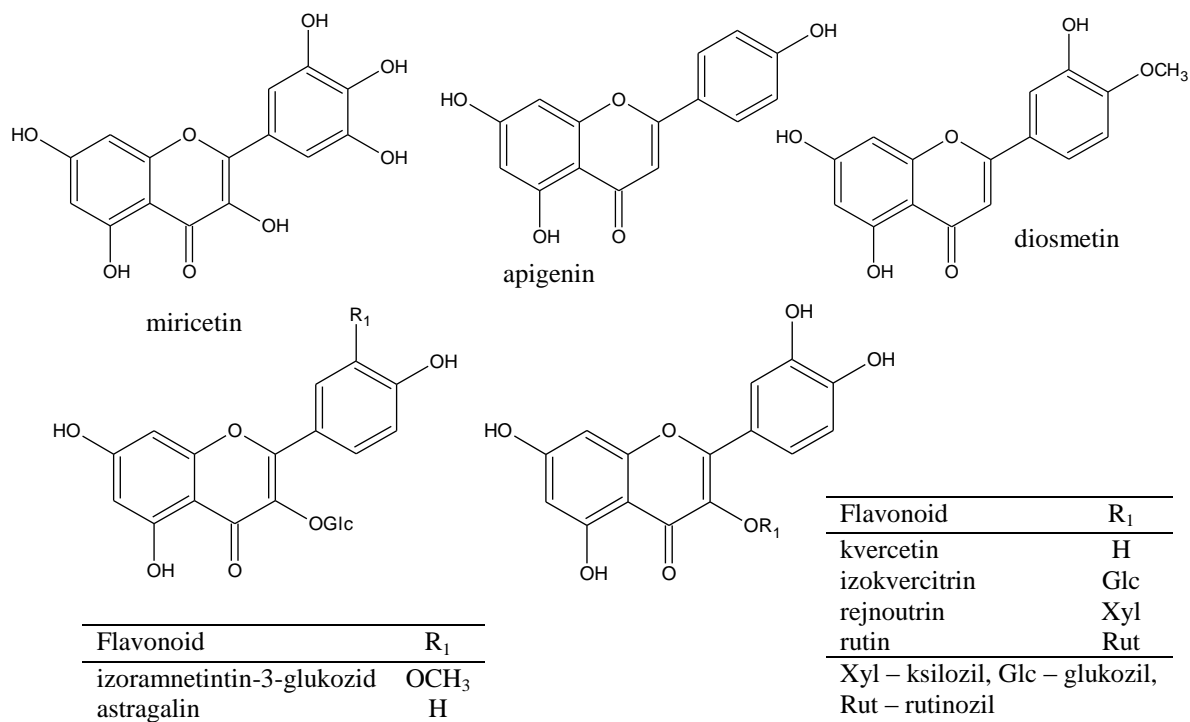
Flavonoid	R ₁	R ₂	R ₃
taksifolin-4'-glukozid	Glc	H	H
taksifolin-3-glukozid	H	Glc	H
taksifolin-7-glukozid	H	H	Glc

Glc - glukozil

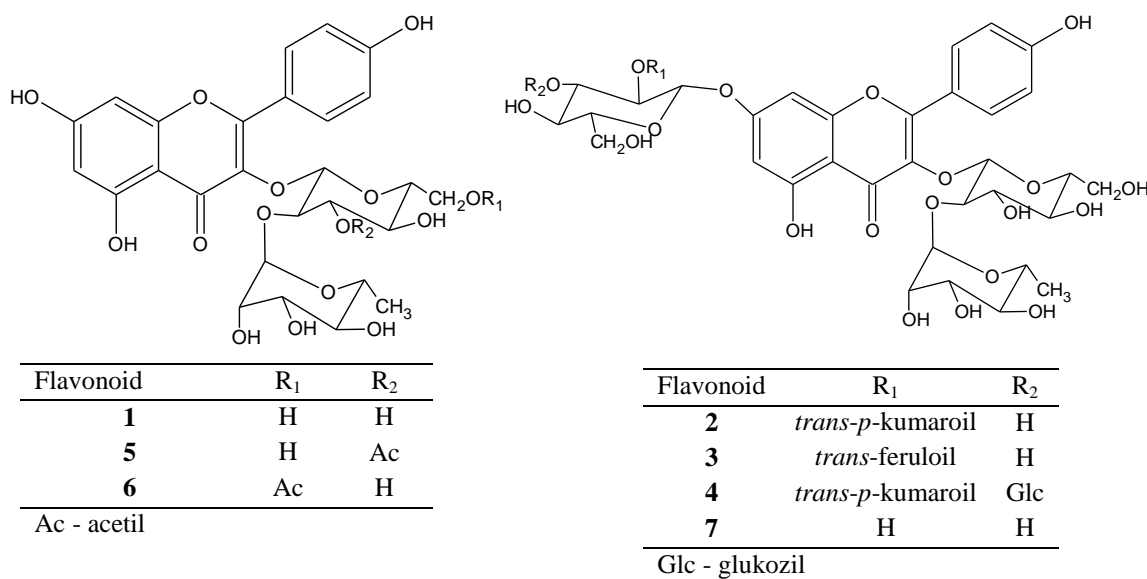
Slika 2.14. Strukture flavonola i njihovih glikozida detektovanih u različitim varijetetima *A. cepa*

Pored u belom i crnom luku, i u većini ostalih vrsta sekcije *Allium* utvrđeno je prisustvo kvercetina i kemferola, kao i njihovih glikozida. Tako *A. ascalonicum* sadrži aglikone kvercetin i izoramnetin i glikozide kvercetin-4'-glukozid, kvercetin-7-glukozid, kvercetin-4',3-diglukozid i izoramnetin-4',3-diglukozid (Fattorusso i drugi, 2002), a *A. ampeloprasum* kemferol-3-O-glukozid, kvercetin-3-O-galaktozid i kvercetin (Bernaert i drugi, 2013). Aglikon kvercetin je identifikovan i u *A. obliquum* i *A. schoenoprasum*, dok je rutin pronađen u *A. senescens* i *A. schoenoprasum*. Flavoni luteolin i apigenin prisutni su u *A. obliquum*, dok su aglikoni kemferola i kvercetina detektovani u vlašcu (*A. schoenoprasum*) (Vlase i drugi, 2012). *A. neapolitanum*, slično belom luku, sadrži flavonole kvercetin, kemferol i izoramnetin u slobodnom obliku i njihove specifične glikozide: kemferol-3-O-[(2-O-ramnozil-4-O-glukozil)-glukozid] i izoramnetin-3-O-[(2-O-ramnozil-6-O-glukozil)-D-glukozid] (Carotenuto i drugi, 1997). Srećuš (*A. ursinum*) i praziluk (*A. porrum*) karakteriše prisustvo kemferola i njegovih glikozida: astragalina (kemferol-3-O-glukozida) i kemferol-3-O-neohesperidozida (**1**) (Slika 2.16). Pored toga srećuš sadrži još i tri nova specifična glikozida kemferola: kemferol-3-O-neohesperozid-7-O-[2-O-(trans-feruloil)]-D-glukozid (**2**), kemferol-3-O-neohesperozid-7-O-[2-O-(trans-p-kumaroil)]-D-glukozid (**3**) i kemferol-3-O-neohesperozid-7-O-[2-O-(trans-p-kumaroil)-3-O-D-glukozil]-D-glukozid (**4**) (Carotenuto i drugi, 1996), kao i kemferol 3-O-ramnozil-(1→2)-[3-O-acetil]-glukozid (**5**),

kemferol-3-*O*-ramnozil (1→2)-[6-*O*-acetil]-glukozid (**6**), kemferol 3,7-diglukozid i kemferol 7-*O*-glukozid-3-*O*-neohesperidozid (**7**) (Slika 2.16.) (Wu i drugi, 2009). Za praziluk (*A. porrum*) je dokazano da pored kemferola i astragalina sadrži i kemferol-3-*O*-[2-*O*-(*trans*-*p*-kumaroil)]-glukozid, kemferol-3-*O*-[2-*O*-(*trans*-3-metoksi-4-hidroksicinamoil)-galaktozil]-(1→4)-*O*-glukozid i kemferol-3-*O*-[2-*O*-(*trans*-3-metoksi-4-hidroksicinamoil)-galaktozil]-(1→6)-*O*-glukozid (Fattorusso i drugi, 2001).



Slika 2.15. Flavonoidi detektovani u *Allium sativum* L.



Slika 2.16. Glikozidi kemferola detektovani u vrsti *Allium ursinum* L.

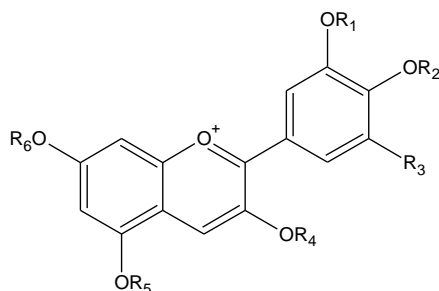
O flavonoidnom profilu vrsta sect. *Codonoprasum* gotovo da uopšte nema podataka u literaturi. Ćurčić i saradnici (2012) utvrdili su da se sadržaj ukupnih fenola u vrsti *A. flavum* kreće u zavisnosti od vrste ekstragensa od 54 do 81 mg ekvivalenata galne kiseline po gramu suvog ekstrakta, dok se sadržaj ukupnih flavonoida kreće od 64 do 96 mg ekvivalenata rutina po gramu suvog ekstrakta. Anačkov je 2009. godine pratio zastupljenost šest flavonoidnih aglikona (luteolin, kvercetin, apigenin, kemferol, tricetin, miricetin) u osam taksona sect. *Codonoprasum* (*A. paniculatum*, *A. flavum*, *A. fuscum*, *A. rhodopeum*, *A. melanantherum*, *A. carinatum* subsp. *carinatum* i *A. carinatum* subsp. *pulchellum*, *A. oleraceum*) i zaključio da je kvercetin zastupljen u svim vrstama, dok se pored kvercetina u vrsti *A. carinatum* subsp. *pulchellum* javlja i flavon luteolin, a u endemičnoj vrsti *A. melanantherum* – kemferol.

U pojedinim varijetetima crnog luka, naročito u crvenom varijetetu (var. *Tropea*), veoma su zastupljeni antocijani. Derivati cijanidina čine preko 50% od ukupnih antocijana, a pored njih su detektovani i derivati delfinidina i petunidina (*Slika 2.17*) (Ferrerres i drugi, 1996; Fosen i drugi, 1996; Gennaro i drugi, 2002; Slimestad i drugi, 2007). Najdominantniji su cijanidin-3-(6"-malonilglukozid), cijanidin 3-(6"-malonil-3"-glukozilglukozid) i cijanidin-3-glukozid. Od šećernih komponenti u antocijanima se javlja glukoza, ali je ona najčeće acilovana i to prvenstveno malonskom kiselinom, a ređe sirćetnom kiselinom. Pored glukoze, može da se javi i disaharid laminariobioza tj. 3-glukozilglukozid, koji je do sada detektovan samo u antocijanima lukova (Fosen i drugi, 1996).

Pored u *A. cepa* L., prisustvo cijanidinskih glikozida – 3-(6"-malonilglukozida), 3-glukozida i 3-(3",6"-dimalonilglukozida) dokazano je i u *A. sativum*, *A. altaicum* i *A. schoenoprasum* (vlašac) (Fosen i drugi, 1996; Fossen i Andersen, 1997). Takođe, 3-(6"-malonil-3"-glukozilglukozida) identifikovan je u stablu *A. altaicum*, a 3-(3"-malonilglukozida) u unutrašnjim obojenim listovima *A. sativum*. Cijanidin-3-glukozid i neidentifikovani acilovani derivati cijanidina nađeni su i u cvetovima *A. aschersonianum* Barb., a petunidin glukozid bez acil ostataka detektovan je u *A. vineale* L. (Fosen i drugi, 1996). Andersen and Fossen (1995) su kao dva glavna antocijana u stablu *A. victorialis* L. identifikovali cijanidin-3-(3",6"-dimalonilglukozid) i cijanidin-3-(3"-malonilglukozid). O prisustvu antocijana u vrstama sect. *Codonoprasum* do sada nema podataka u literaturi.

Antocijani imaju C₆-C₃-C₆ strukturu, tipičnu za flavonoide, uglavnom su penta- ili heksa-supstituisani, sa obaveznom hidroksilnom grupom na C-3 atomu, dok se ostali supstituenti (hidroksilna ili metoksi grupa) mogu nalaziti na C-5, C-7, C-3', C-4' i C-5'. U prirodi se antocijani javljaju uvek u obliku glikozida, a najčešće je glikozilovana C₃-hidroksilna grupa. Antocijani daju plodovima, lišću i cveću crvenu, ljubičastu i plavu boju (Francis, 1989). Za neke antocijane dokazano je antioksidantno, antikancerogeno i antiinflamatorno delovanje, a sprečavaju i oksidaciju lipida i proteina u hrani.

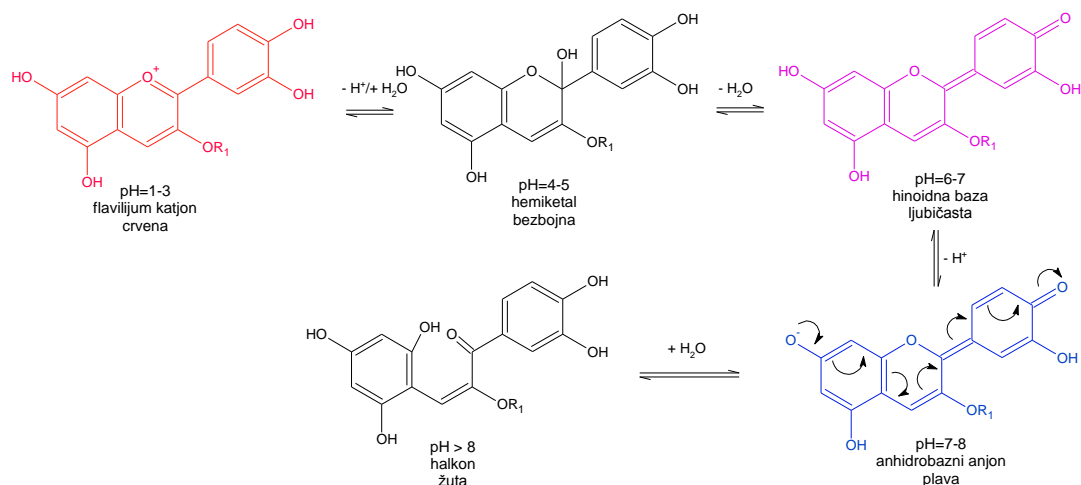
Antocijani su veoma nestabilna jedinjenja, pa se njihov sadržaj znatno smanjuje tokom čuvanja lukova u skladištima (Gennaro i drugi, 2002). Na stabilnost antocijana najviše utiču pH, temperature i stepen glikozilacije (Fossen i drugi, 1998b). Sa porastom broja šećernih komponenti i još dodatnim acilovanjem ovih komponenti, povećava se stabilnost antocijana, kao i njihova rastvorljivost u vodi (Ferrerres i drugi, 1996; Torskangerpoll i Andersen, 2005). U zavisnosti od pH rastvora antocijani menjaju boju od crvene do plave (*Slika 2.18.*) (Lapidot i drugi, 1999; Fleschhut i drugi, 2006). Pored toga, na boju utiče broj i vrsta supstituenata, pa se tako sa porastom broja hidroksilnih grupa pojačava plava boja antocijana, dok se sa porastom broja metoksi grupa ili glikozidnih veza pojačava crvena boja.



Antocijanin	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
cijanidin-3-glukozid	H	H	H	Glc	H	H
cijanidin-3-(3''-glukozilglukozid)	H	H	H	Lam	H	H
cijanidin-3-(3''-malonilglukozid)	H	H	H	3''-MalGlc	H	H
cijanidin-3-(6''-malonilglukozid)	H	H	H	6''-MalGlc	H	H
cijanidin-3-(3''-glukozil-6''-malonilglukozid)	H	H	H	6''-MalLam	H	H
cijanidin-3-(3'',6''-dimalonilglukozid)	H	H	H	3'', 6''-di-MalGlc	H	H
cijanidin-3-(dimalonil) laminariobiozid	H	H	H	di-MalLam	H	H
cijanidin-3-(3''-acetilglukozid)	H	H	H	3''-AcGlc	H	H
cijanidin-3-(malonil)(acetil) glukozid	H	H	H	Mal-Ac-Glc	H	H
cijanidin-3,5-diglukozid	H	H	H	Glc	Glc	H
cijanidin-3-(malonil)-glukozid-5-glukozid	H	H	H	MalGlc	Glc	H
cijanidin-4'- glukozid	H	Glc	H	H	H	H
cijanidin-3,4'- di glukozid	H	Glc	H	Glc	H	H
cijanidin-3-(3''-glukozil-6''-malonilglukozid)-4'-glukozid	H	Glc	H	6''-MalGlc	H	H
cijanidin-7-(3''-glukozil-6''-malonilglukozid)-4'-glukozid	H	Glc	H	Glc	H	6''-Mal
peonidin-3-glukozid	CH ₃	H	H	Glc	H	H
peonidin-3-(6''-malonilglukozid)	CH ₃	H	H	6''-MalGlc	H	H
peonidin-3,5-di glukozid	CH ₃	H	H	Glc	Glc	H
peonidin-3-(6''-malonilglukozid)-5-glukozid	CH ₃	H	H	6''-MalGlc	Glc	H
delfinidin-3- glukozid	H	H	OH	Glc	H	H
delfinidin-3-glukozilglukozid	H	H	OH	GlcGlc	H	H
petunidin-glukozid	CH ₃	H	OH	Glc	H	H
petunidin-(glukozilglukozid)	CH ₃	H	OH	GlcGlc	H	H

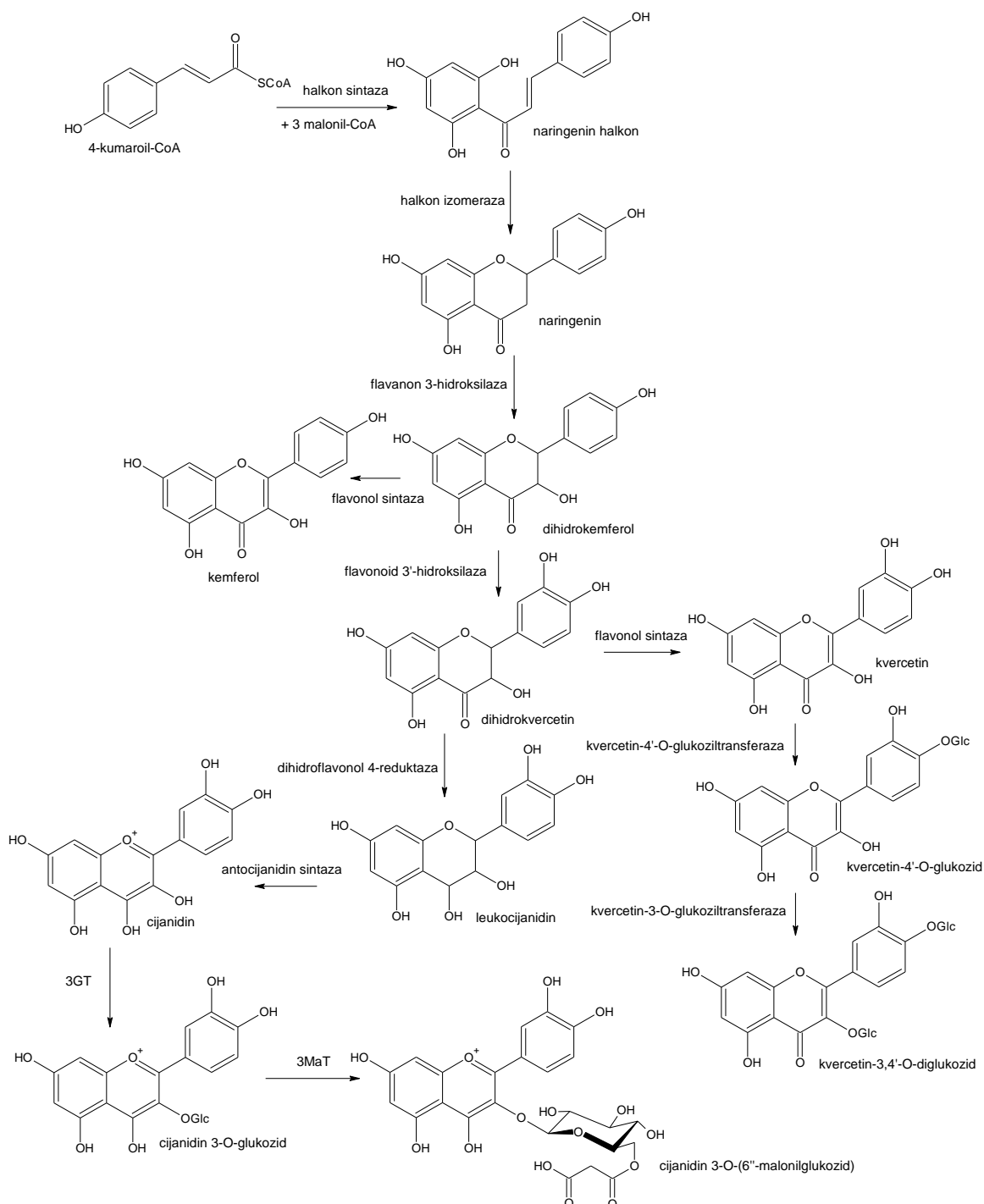
Glc – glukozil; Lam – laminariobiozil; Mal – malonil; Ac – acetil

Slika 2.17. Antocijani detektovani u vrsti *A. cepa* L. (Slimestad i drugi, 2007)



Slika 2.18. Promena strukture i boje antocijana sa promenom pH

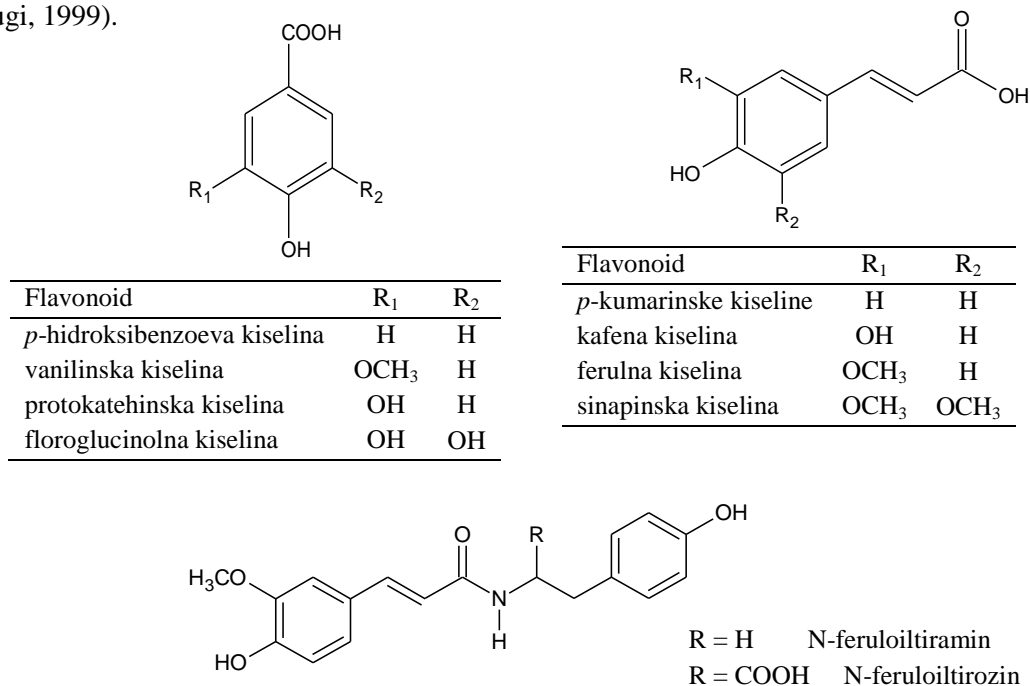
Masuzaki i saradnici su 2006. godine (2006a; 2006b) izvršili kompletnu asignaciju gena uključenih u biosintezu flavonoida u *A. cepa* i predložili biosintetski put prikazan na *Slici 2.19*. Početne faze ovog puta zajedničke su za sve flavonoide i obuhvataju kondenzaciju tri molekula malonil-CoA sa molekulom 4-kumaroil-CoA posredstvom enzima halkon-sintaze. Na ovaj način formira se aktivirana poliketidna struktura čijom ciklizacijom nastaje nestabilni halkonski skelet (naringenin-halkon).



Slika 2.19. Predloženi put biosinteze flavonoida u *A. cepa* L. (Skrtaćenice: 3GT – UDP glukoza: flavonoid 3-O-glukoziltransferaza, 3MaT – malonil coenzim-A : antocijanidin 3-O-glukozid-6''-O-maloniltransferaza) (Masuzaki i drugi, 2006a; Masuzaki i drugi, 2006b)

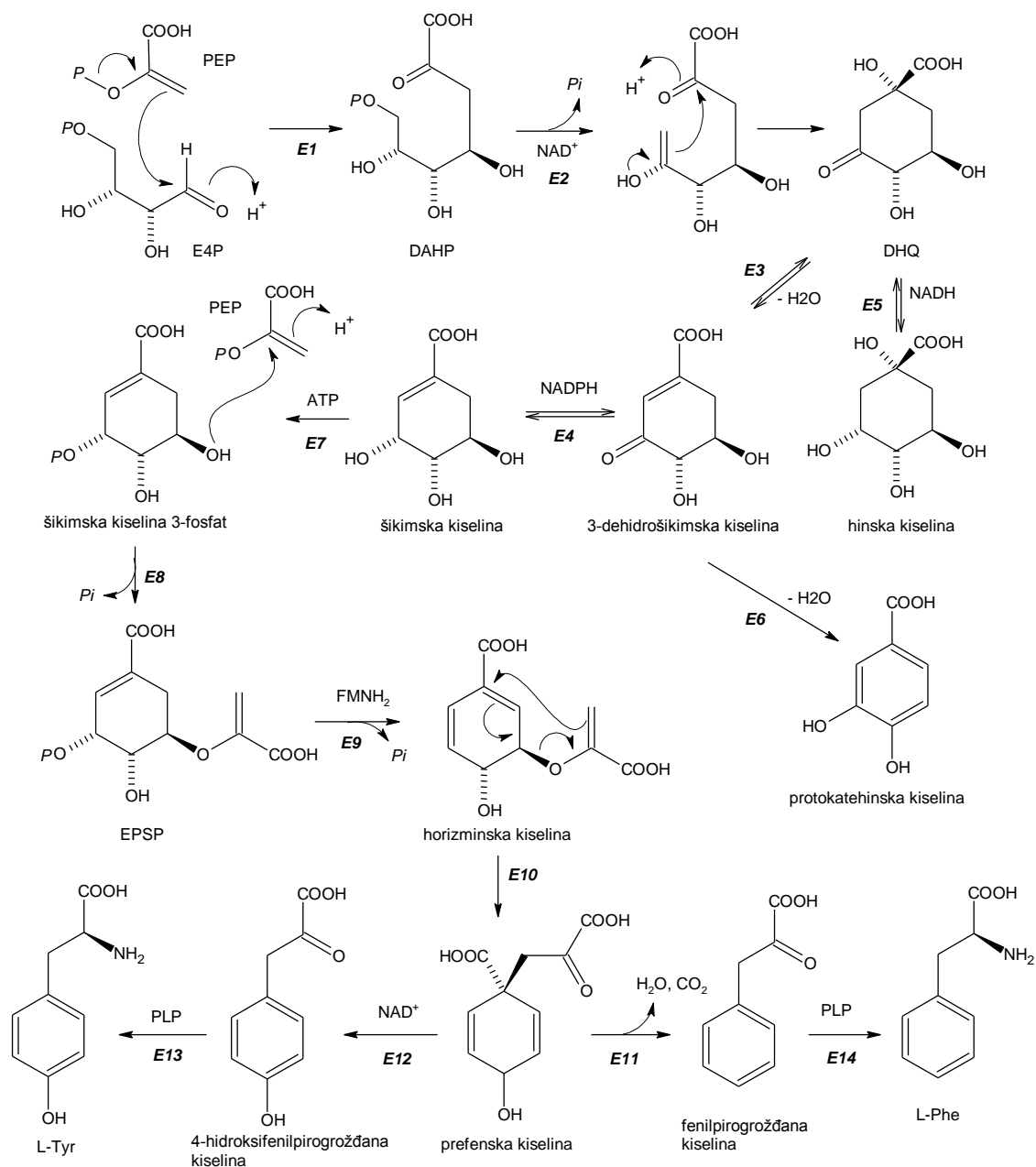
U sledećoj fazi delovanjem halkon izomeraze dolazi do ciklizacije i nastajanja piranskog prstena i formiranja molekula flavanona (naringenin). Dalji redosled transformacija nastalog flavanona specifičan je za određene biljne vrste. Kod crnog luka hidroksilacijom naringenina nastaje dihidroksikemferol, a od njega se dalje računaju tri puta, od kojih jedan vodi ka sitezi kemferola i njegovih derivata, drugi ka sintezi kvercetina i njegovih derivata, a treći ka sintezi antocijana.

Fenolkarbonske kiseline su u lukovima znatno manje zastupljene od flavonoida. U lukovici belog luka od fenolkarbonskih kiselina najzastupljenije su kafena i ferulna kiselina, dok su *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska i *p*-kumarinska kiselina prisutne u nešto manjoj količini, a sinapinska kiselina u tragovima (Slika 2.20.) (Brewster i Rabinowich, 1990; Gorinstein i drugi, 2008; Beato i drugi, 2011). U nadzemnim delovima i korenu belog luka je pored ovih kiselina detektovana i 5-O-kafeoil-hinska kiselina (hlorogenska kiselina) (Tuan i drugi, 2010). Hlorogenska kiselina je takođe pronađena i u *A. cepa*, *A. pskemense*, *A. galantum* i *A. fistulosum* (Runkova i Talieva, 1970). U spoljašnjoj tunici crnog luka nađena je protokatehinska kiselina, floroglucinol, katehol, *p*-hidroksibenzoeva, sinapinska, vanilinska i *p*-kumarinska kiselina, kao i metilestri protokatehinske i floroglucinolne kiseline (Fenwick i Hanley, 1990; Ly i drugi, 2005; Gorinstein i drugi, 2008). Jestivi deo lukovice crnog luka sadrži samo protokatehinsku kiselinu, floroglucinol, katehol i ferulnu kiselinu, dok se u lišću nalaze kafena kiselina i estri *p*-kumarinske i ferulne kiseline (Fenwick i Hanley, 1990). *A. ampeloprasum* sadrži ferulnu kiselinu kao dominantnu komponentu, a pored nje i sinapinsku i kafenu kiselinu i propilgalat (Bernaert i drugi, 2013). U lukovici i listovima *A. ursinum* utvrđeno je prisustvo ferulne, vanilinske i *p*-kumarinske kiseline, dok je *p*-hidroksibenzoeva kiselina nađena samo u lukovici (Đurđević i drugi, 2004). Praziluk sadrži ferulnu i kafenu kiselinu, metil-kafeat i tragove *p*-kumarinske i sinapinske kiseline (Fenwick i Hanley, 1990). *p*-Kumarinska i ferulna kiselina detektovane su i u etanolnim ekstraktima *A. senescens*, *A. obliquum* i *A. schoenoprasum*, dok je sinapinska kiselina bila prisutna samo u *A. schoenoprasum* (Vlase i drugi, 2012). Analizom hemijskog sastava korena belog luka i praziluka otkriveno je prisustvo N-feruloiltiramina i novog fenolnog jedinjenja N-feruloiltirozina (Slika 2.20) (Fattorusso i drugi, 1999).



Slika 2.20. Fenolna jedinjenja detektovana u lukovima

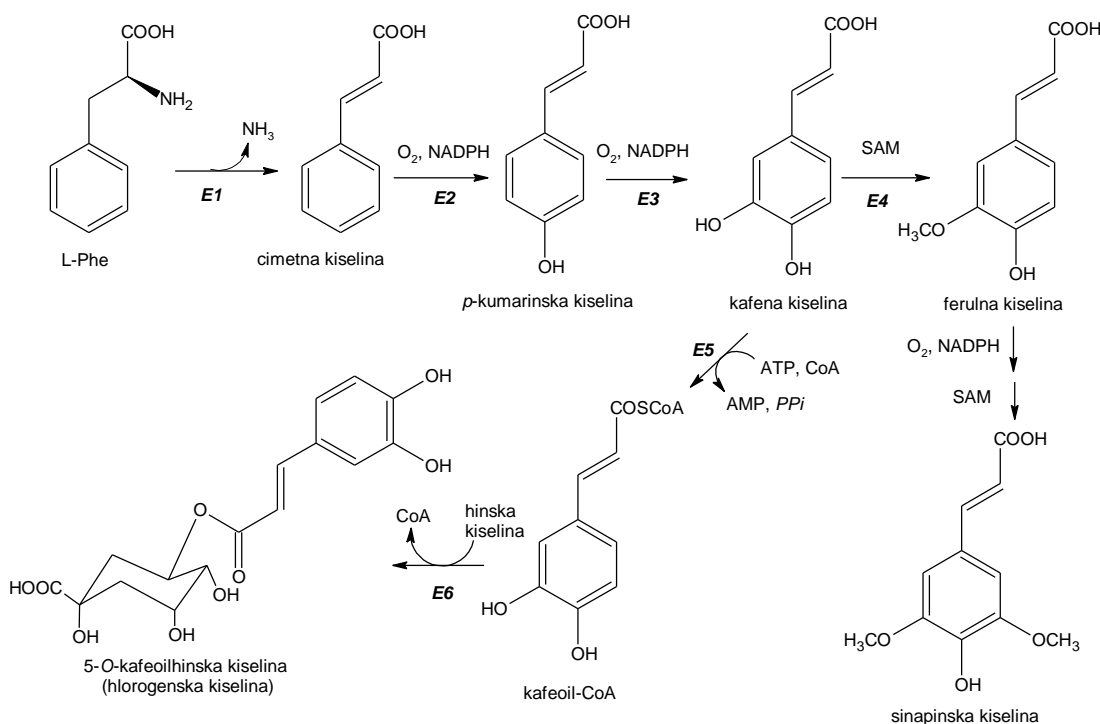
Fenolkarbonske kiseline u biljkama nastaju putem šikimske kiseline (Slike 2.21.i 2.22.) (Dewick, 2009). Ovaj biosintetski put započinje aldolnom kondenzacijom eritroza-4-fosfata (E4P) koji potiče iz pentoza-fosfatnog puta i fosfoenolpiruvata (PEP) iz glikolize, pri čemu nastaje 3-deoksi-D-arabino-heptulozonska kiselina-7-fosfat (DAHP). U narednih nekoliko reakcija (eliminacija fosfata iz DHAP praćena intramolekulskom aldolnom kondenzacijom) nastaje 3-dehidrohinska kiselina, čijom redukcijom se formira hinska kiselina, prilično uobičajeni prirodni proizvod koji se javlja kako u slobodnoj formi tako i u obliku estara. Iz 3-dehidrohinske kiseline u dva koraka (dehidratacija i redukcija) nastaje ključni intermedijer ovog biosintetskog puta – šikimska kiselina.



Slika 2.21. Biosintetski put fenolkarbonskih kiseline zastupljenih u lukovima (Dewick, 2009; Tuan i drugi, 2010). PEP – fosfoenol piruvat (iz glikolize), E4P – eritroza-4-fosfat (iz pentoza-fosfatnog puta), DAHP – 3-deoksi-D-arabino-heptulozonska kiselina-7-fosfat, DHQ – 3-dehidrohinska kiselina, EPSP – 5-enolpiruvilšikimska kiselina 3-fosfat, SAM – S-adenozilmetionin, E1 – DAHP sintaza, E2 – 3-dehidrohinat sintaza, E3 – 3-dehidrohinaza, E4 – šikimat dehidrogenaza, E5 – hinat dehidrogenaza, E6 – 3-dehidrošikimat dehidrataza, E7 – šikimat kinaza, E8 – EPSP sintaza, E9 – horizmat sintaza, E10 – horizmat mutaza, E11 – prefenat dehidrataza, E12 – prefenat dehidrogenaza, E13 – 4-hidroksifenilpiruvat aminotransferaza, E14 – fenilpiruvat aminotransferaza

Dehidratacija i enolizacija 3-dehidrošikimske kiseline vodi nastanku protokatehinske kiseline. Šikimska kiselina se prevodi u horizminku kiselinu u nekoliko koraka (fosforilacija, inkorporacija još jednog molekula PEP po mehanizmu adicije-eliminacije, 1,4-eliminacije fosfata). Reakcijom Claisen-ovog premeštanja horizmat prelazi u prefenat iz koga dalje nastaju osnovni C₆C₃ građivni blokovi – aromatične aminokiseline L-fenilalanin i L-tirozin (Slika 2.21).

Daljim transformacijama L-fenilalanina i L-tirozina dobijaju se različite klase polifenolnih jedinjenja. Eliminacijom amonijaka iz L-Phe fenilalanina dolazi do formiranja *E*-cimetne kiseline. Kod većine biljaka, pa i kod lukova (Tuan i drugi, 2010), hidroksilacijom cimetne kiseline u citohrom-P450 zavisnoj reakciji nastaje *p*-kumarinska kiselina (*p*-hidroksicimetna kiselina), prekursor u biosintezi fenilpropena, kumarina, lignana, flavonoida, izoflavonoida, ksantona, stilbena i tanina. Tako daljim hidroksilacijama i metilacijama *p*-kumarinske kiseline nastaju uobičajene prirodne fenilpropenske kiseline – kafena, ferulna i sinapinska. One se u biljkama javljaju u slobodnoj formi ili u obliku estara. Najčešće grade estre sa hinskom kiselinom pri čemu nastaju hlorogenske kiseline (npr. 5-*O*-kafeoilhinska kiselina) (Slika 2.22).

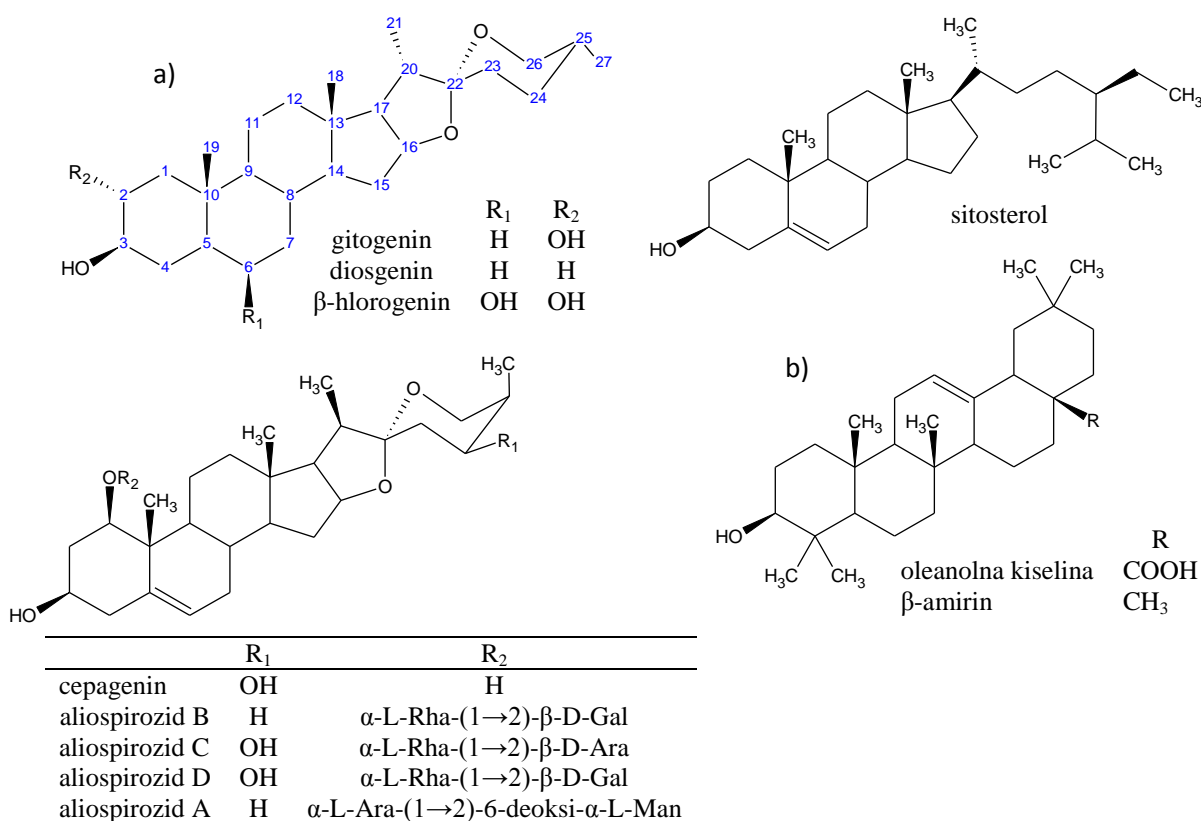


Slika 2.22. Biosintetski put fenilpropenskih kiselina zastupljenih u lukovima (Dewick, 2009). SAM – S-adenozilmetionin, E1 – fenilalanin-amonijak lijaza, E2 – cinamat 4-hidroksilaza, E3 – *p*-kumarat 3-hidroksilaza, E4 – kafena kiselina *O*-metiltransferaza, E5 – CoA ligaza, E6 – hinat *O*-hidroksicinamoiltransferaza

2.3.4 Saponini

Lukovi su veoma bogati steroidnim saponinima. Saponini su velika grupa sekundarnih biomolekula, široko rasprostranjenih u zelenim biljkama, spadaju u površinski aktivne materije i u vodenim rastvorima obilno pene. Uglavnom se nalaze u obliku glikozida, a mogu se podeliti u dve grupe prema prirodi aglikonskog skeleta (sapogenina). Prvu grupu čine steroidni, a drugu triterpenski saponini. Steroidni saponini sastoje se od steroidnog aglikona – spirostanskog skeleta od 27 C atoma (C_{27}), kod koga je za C_{22} vezan katrakterističan šestočlani heterociklični prsten (Slika 2.23. a). U nekim slučajevima je hidroksilna grupa na položaju 26 glikozilovana, pa dolazi do otvaranja ovog heterocikličnog prstena, pri čemu nastaje furostanski skelet (Slika 2.25.). Aglikon triterpenskkih saponina izgrađen je od 30 C atoma (C_{30}), koji formiraju pentacikličnu strukturu (Slika 2.23. b).

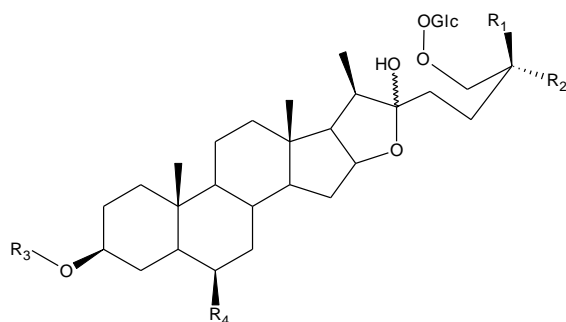
Iako su istraživanja biljnih saponina počela još 70-ih godina prošlog veka, oni su tek nedavno dobili veću pažnju, kada je otkriveno da učestvuju u važnim biološkim procesima i imaju sposobnost da deluju kao prirodni lekovi kod mnogih bolesti (Lanzotti, 2006). Prvi izolovani sapogenini iz belog i crnog luka i praziluka bili su sitosterol, oleanolna kiselina, gitogenin i amirin (Slika 2.23.) (Smoczkiwicz i drugi, 1982). Ubrzo zatim utvrđeno je prisustvo β -hlorogenina u crnom i belom luku, sapogenina diosgenina i cepagenina, kao i saponina aliospirozida A–D i aliofurozida A u crnom luku (Slika 2.23.) (Kravets i drugi, 1990).



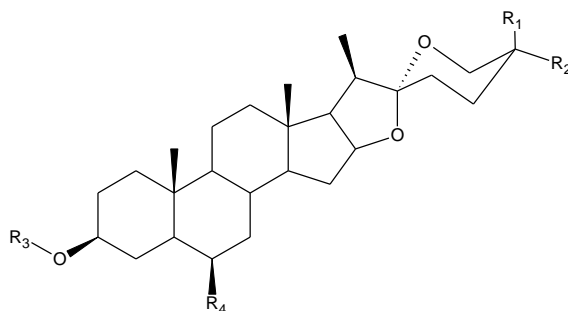
Slika 2.23. Hemijske strukture sapogenina i saponina izolovanih iz crnog i belog luka i praziluka. a) spirostanski skelet steroidnih sapogenina, b) pentaciklični skelet triterpenskkih sapogenina

Iz belog luka izolovani su furostanol proto-erubozid B i njegov spirostanolni analog erubozid B, a nešto kasnije i njihovi epimeri proto-*izo*-erubozid B i *izo*-erubozid B (Slika 2.24). Takođe, tri sativozida (B1, R1 i R2) i proto-dezgalaktotigonin (Slika 2.24) pronađeni su u belom luku u

kasnijim istraživanjima (Lanzotti, 2006). Iz vrste *Allium ascalonicum* Hort. izolovani su furostanski saponini eskalonikozid A1/A2 i eskalonikozid B (Slika 2.25.) (Fattorusso i drugi, 2002), a zatim je njihovo prisustvo dokazano i u vrsti *A. cepa* L. var. *tropea*, pored još četiri nova furostanska saponina – tropeozida A1 i A2 i tropeozida B1 i B2 (Slika 2.25.) (Corea i drugi 2005).

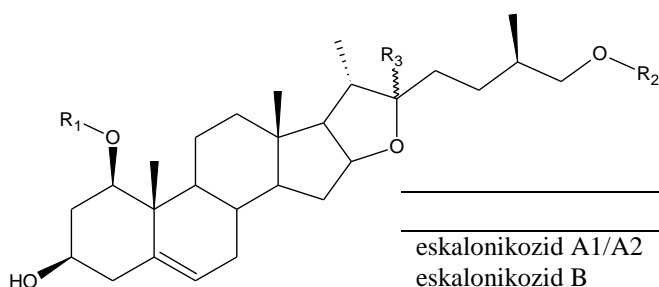


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
proto-erubozid B	H	CH ₃	Glc-(1→2)-[Glc-(1→3)]-Glc-(1→4)-Gal	OH
proto- <i>izo</i> -erubozid B	CH ₃	H	Glc-(1→2)-[Glc-(1→3)]-Glc-(1→4)-Gal	OH
sativozid B1	H	CH ₃	Glc-(1→3)-Glc-(1→2)-[Glc-(1→3)]-Glc-(1→4)-Gal	OH
sativozid R1	H	CH ₃	Glc-(1→3)-Glc-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-Glc-(1→4)-Gal	H
proto-dezgalaktotigonin	H	CH ₃	Glc-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-Glc-(1→4)-Gal	H



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
erubozid B	H	CH ₃	Glc-(1→2)-[Glc-(1→3)]-Glc-(1→4)-Gal	OH
<i>izo</i> -erubozid B	CH ₃	H	Glc-(1→2)-[Glc-(1→3)]-Glc-(1→4)-Gal	OH
sativozid R2	H	CH ₃	Glc-(1→3)-Glc-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-Glc-(1→4)-Gal	H

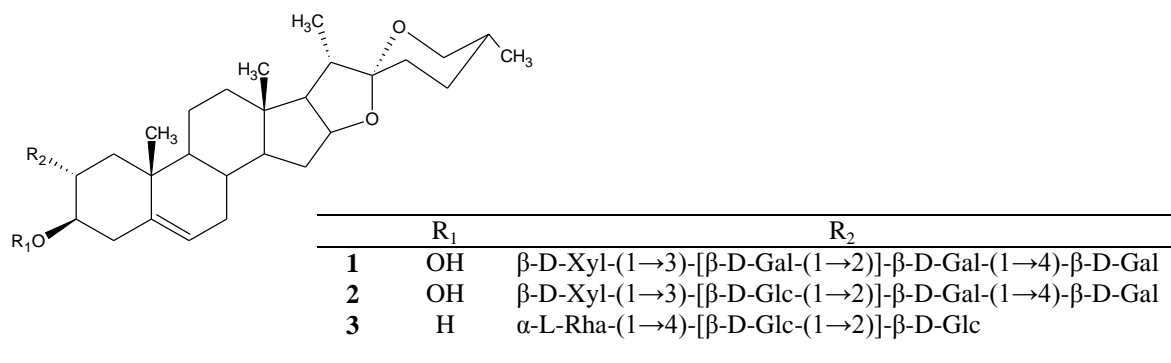
Slika 2.24. Hemijske strukture saponina izolovanih iz belog luka



	R ₁	R ₂	R ₃
eskalonikozid A1/A2	Gal	Glc-Rha	α -OH / β -OH
eskalonikozid B	Gal	Glc-Rha	H
tropeozid A1/A2	Gal	Rha	α -OH / β -OH
tropeozid B1/B2	Xyl	Rha	α -OH / β -OH

Slika 2.25. Hemijske strukture furostanskih saponina izolovanih iz vrste *Allium ascalonicum* Hort. i *Allium cepa* L. var. *tropea*

Tri nova saponina tipa spirostana izolovana su iz vrste *Allium flavum* (Rezgui i drugi, 2014). Njihove strukture prikazane su na *Slici 2.26*. O zastupljenosti saponina u ostalim vrstama roda *Allium* sect. *Codonoprasum* za sada nema literaturnih podataka.



Slika 2.26. Hemijske strukture saponina izolovanih iz vrste *Allium flavum* L.

Biološke aktivnosti steroidnih sponina još uvek nisu dovoljno istražene, ali pojedina istraživanja ukazuju na to da je njihov biološki potencijal veoma velik, i da obuhvata sposobnost da blokiraju apsorpciju holesterola (kome su strukturno veoma slični), potpomažu njegovo izlučivanje iz organizma, smanjuju rizik od ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti (Calpe-Berdiel i drugi, 2009). Takođe, ova jedinjenja imaju anti-inflamatorna i imunomodulatorna svojstva i smanjuju rizik od raka dojke, prostate i debelog creva (Woyengo i drugi, 2009; Bouic, 2002; Jones i AbuMweis, 2009).

2.3.5 Hemotaksonomska istraživanja roda *Allium*

Hemotaksonomija (hemosistematika) je interdisciplinarna nauka koja predstavlja pokušaj da se klasifikuju i identifikuju biljke na osnovu sličnosti i razlika u njihovom biohemijskom sastavu. Tako se podaci o morfološkim karakteristikama biljaka upotpunjuju podacima o njihovom hemijskom sastavu, što omogućava lakše uočavanje inter- i infraspecijskih filogenetskih odnosa. Od svih sekundarnih biomolekula biljaka, flavonoidi su se pokazali kao najpogodniji hemotaksonomski markeri, i to iz nekoliko razloga: prisutni su u svim vaskularnim biljkama (naročito flavoni i flavonoli), relativno lako se izoluju i identifikuju, izrazito su strukturno varijabilni, struktura im je genetski uslovljena i uglavnom ne zavisi od ekoloških faktora, a takođe su i hemijski veoma stabilni, pa se mogu izolovati kako iz svežeg, tako i iz herbarskog materijala (Harborne, 1977; Harborne, 1998; Crawford i Giannasi, 1982). Takođe, flavonoidi imaju veoma važne uloge za opstanak biljaka (zaštita od UV zračenja, atraktanti za potencijalne oprašivače i raznosaače semena), što ukazuje na njihov evolutivni značaj, a samim tim i značaj u filogeniji biljaka (Marin, 1996).

Hemotaksonomska istraživanja sa flavonoidima kao markerima sprovedena su na skoro svim nivoima klasifikacije, a najčešće na nivou roda (Essokne i drugi, 2012; Nikolova i drugi, 2005; Ohshima i drugi, 1995). Tako je za neka jedinjenja utvrđeno da su prisutna u svim ispitivanim vrstama datog roda, pa su okarakterisana kao markeri roda, dok su druga jedinjenja specifična za pojedine vrste, pa je na osnovu njihovog prisustva ili odsustva moguće izvršiti infrageneričku klasifikaciju. Takođe, moguće je utvrditi odnose između morfološki bliskih vrsta ili izvršiti podelu na hemotipove u okviru jedne vrste (infraspecijska varijabilnost) (Crawford i Mabry, 1978; Marin i

drugi, 2003). Mnogi autori pokušali su da utvrde i značaj flavonoida na višim nivoima klasifikacije (tribusi, podfamilije, familije), pokušavajući da otkriju filogenetske veze između ispitivanih taksona, ali to uglavnom nije bilo moguće zbog velikog broja vrsta i velikih varijacija u flavonoidnom sastavu (Gornall, 1979; Bruce i Stuessy, 2001; Emerenciano i drugi, 2001). Konačno, sastav flavonoida pokazao se i kao vrlo koristan u istraživanjima interspecijske hibridizacije (Wyatt i Hunt, 1991).

Rod *Allium* obuhvata veoma veliki broj vrsta (preko 780) široko rasprostranjenih na skoro čitavoj severnoj polulopti Zemlje. Međutim, dostupni podaci o mnogim vrstama su veoma oskudni i nepotpuni, zbog čega se u taksonomiji javljaju veliki problemi prilikom podela ovog roda na podrodove, a pogotovo na sekcije (Kusterer, 2010). Takođe, tačna determinacija nekih vrsta samo na osnovu botaničkih karakteristika je veoma teška. Zbog toga je pronalaženje novih hemotaksonomskih markera karakterističnih za pojedine podrodove i sekcije od velikog značaja. Takođe, otkrivanje intraspecijskih varijacija u hemijskom sastavu može da bude od koristi prilikom podele vrsta na podvrste i varijetete.

U literaturi su zabeleženi pokušaji razvrstavanja vrsta roda *Allium* u grupe na osnovu prisustva ili odsustva određenih flavonoida kao hemotaksonomskih markera (Harborn i Williams, 1996; Anačkov, 2009; Božin, 2009). Tako su predstavnici tipične sekcije *Allium* (Stearn, 1980) podeljeni u tri grupe na osnovu sadržaja pojedinih klasa fenolnih jedinjenja (fenoli, flavonoidi i antocijani) (Božin, 2009). Na taj način utvrđena je bliskost, odnosno udaljenost pojedinih taksona ove sekcije, što je doprinelo razjašnjavanju njihove sistematske pozicije. Ovo je naročito važno s obzirom da u sekciji *Allium* jedino *A. sativum* i *A. atroviolaceum* imaju jasnu sistematsku poziciju (Anačkov, 2003), dok je sistematika ostalih predstavnika i dalje otvoreno pitanje zbog značajne morfološke varijacije između vrsta. Na primeru vrste *A. sativum* dokazano je da je sastav fenolnih jedinjenja stabilan u različitim fazama ontogenetskog razvoja (Božin, 2008), a na primeru vrste *A. flavum* da ne postoji značajna razlika u kvalitativnom sastavu dominantnih flavonoida u uzorcima sa različitih lokaliteta (Anačkov, 2009), što je potvrdilo opravdanost korišćenja ovih jedinjenja kao hemotaksonomskih markera.

Istraživanja Harborn-a i Williams-ove (1996) na vrstama koje su gajene pod istim ekološkim uslovima pokazala su da se u cilju grupisanja vrsta kao markeri mogu koristiti aglikoni flavona i flavonola, pri čemu su predstavnici sekcije *Allium* podeljeni na tri grupe: vrste koje sadrže isključivo flavone, isključivo flavonole i vrste koje sadrže i flavone i flavonole. U okviru novijih hemotaksonomskih istraživanja vršena je detekcija šest aglikona flavonoida (tri flavona – apigenin, luteolin, tricin, i tri flavonola – kemferol, kvercetin, miricetin) u metanolnim ekstraktima 29 taksona roda *Allium* (Anačkov, 2009). Izdvojene su tri grupe vrsta na osnovu prisustva ili odsustva ispitivanih aglikona: prva grupa sadrži isključivo kvercetin, druga isključivo kemferol, a treća kombinaciju ova dva aglikona. U prvu grupu spada i šest od osam ispitivanih taksona sekcije *Codonoprasum*, što ukazuje na potencijalni filogenetski značaj prisustva kvercetina u taksonima ove sekcije.

Fossen i saradnici (1996) su u vrstama roda *Allium* detektovali cijanidin 3-(3",6"-dimalonilglukopiranozid) i ukazali na moguć hemotaksonomski značaj ovog antocijana, s obzirom da izvan roda *Allium* do sada nikada nisu nađeni antocijani supstituisani u položaju-3 šećerne komponente.

Pored flavonoida, kao hemotaksonomski markeri vrsta roda *Allium*, korišćena su i četiri najdominantnija cistein-sulfoksida: aliin, metiin, isoaliin i propiin (Fritsch i Keusgen, 2006), gde su na osnovu sličnosti i razlika u njihovoj zastupljenosti pokušani da se uspostave odnosi između evolutivnih linija roda *Allium* (vrste roda *Allium* podeljene su na tri evolutivne linije na osnovu sekvencionih DNA analiza). Ako se uporede ukupni sadržaji cistein-sulfoksida u tri evolutivne

linije roda *Allium*, može se zaključiti da je u trećoj evolutivnoj liniji (u koju spada podrod *Allium*) ovaj sadržaj znatno veći nego u prvoj, dok su u drugoj liniji cistein-sulfoksidi prisutni samo u tragovima (Fritsch i Keusgen, 2006). Metiin je prisutan u velikim količinama u gotovo svim vrstama sve tri evolutivne linije, pa je podela na hemotipove izvršena na osnovu relativnog sadržaja ostala tri cistein-sulfoksida. Prvi hemotip karakteriše prisustvo izoaliina kao dominantnog cistein-sulfoksida i u ovu grupu spadaju vrste koje ljudi široko primenjuju u ishrani, pre svega crni luk i luk vlašac. U drugi hemotip spadaju vrste u kojima dominira aliin, gde je beli luk najpoznatiji predstavnik, u trećem hemotipu su podjednako zastupljeni aliin i izoaliin (spadaju *A. ursinum*, *A. vineale*, *A. tuberosum*), u četvrtom dominiraju metiin i propiin (*A. mobilense*, *A. canadense*), u petom metiin i aliin (*A. obliquum*, *A. cupanii*, *A. saxatile*), dok šesti hemotip karakteriše samo visok sadržaj metiina (Fritsch i Keusgen, 2006). U ovaj poslednji hemotip svrstane su i dve ispitivane vrste iz sekcije *Codonoprasum* (*A. oleraceum* i *A. carinatum*).

2.4 MOLEKULSKE OSNOVE BOLESTI

2.4.1 Oksidativni stres

Oksidativni stres je stanje organizma u kome dolazi do narušavanja ravnoteže između produkcije reaktivnih oblika kiseonika (ROS - Reactive Oxygen Species) (Tabela 2.5.) i sposobnosti organizma da ih neutrališe i ukloni. Ovo je stanje visokog rizika za nastajanje najrazličitijih obolenja, kao što su: akutni i hronični zapaljenski procesi (reumatoidni artritis, vaskulitis), neurološki poremećaji (Alchajmerova bolest, Parkinsonova bolest, cerebrovaskularna oštećenja, mišićna distrofija), kardiovaskularni poremećaji (hipertenzija i hipertenzivna bolest srca, ateroskleroza), fibroza pluća, katarakta, maligne bolesti, prerano starenje.

Pored ROS, u reaktivne vrste koje se javljaju u organizmu (RS) spadaju još i reaktivni oblici azota (RNS - Reactive Nitrogen Species), reaktivni oblici hlora (RCS - Reactive Chlorine Species) i reaktivni oblici broma (RBS - Reactive Bromine Species) (Halliwell, 2006) (tab. 2.1).

Nemaju sve RS istu reaktivnost. Naime, H_2O_2 , NO^\bullet i $O_2^{\bullet-}$ brzo reaguju, ali sa svega nekoliko molekula, RO_2^\bullet , NO_3^\bullet , RO^\bullet , $HOCl$, $HOBr$, $CO_3^{\bullet-}$, $CO_2^{\bullet-}$, NO_2^\bullet , $ONOO^-$, NO_2^+ i O_3 imaju srednju reaktivnost, dok OH^\bullet brzo reaguje sa skoro svim molekulima u organizmu (Halliwell, 2006).

Slobodni kiseonični radikali, kao što su superoksid anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikal (OH^\bullet), peroksil radikal (ROO^\bullet) nastaju u organizmu aerobnih organizama tokom metaboličkih procesa kao što su: oksidativna fosforilacija u respiratornom nizu mitohondrija, oksidacija ćelijskih biomolekula (mioglobina, tetrahidropterina, tiola, hidrohina, kateholamina, hemoglobina, flavoproteida), katalitičke reakcije nekih enzima (NADPH-zavisne oksidaze, ksantinoksidaze, lipoksigenaze, prostaglandin sintaze, NADPH-zavisne dehidrogenaze, monoamino oksidaze, ciklooksgenaze, NADPH-citohrom P-450 reduktaze i dr.), reakcije oksido-redukcije katalizovane metalima sa promenljivom valencom, sinteza eikosanoida, transformacija ksenobiotika u mikrozomima, lipidna peroksidacija nezasićenih masnih kiselina, aktivnost fagocitnih ćelija (Halliwell i Gutteridge, 1992; Sayre i drugi, 1999; Cadenas i Davies, 2000). NO_2^\bullet nastaje *in vivo* iz $ONOO^-$ delovanjem mieloperoksidaze (Augusto i drugi, 2002.). Ozon se takođe može proizvoditi *in vivo*, ali tačan mehanizam nije poznat (Wentworth i sar, 2003). Osim ovih, tzv. endogenih izvora slobodnih radikala postoje i egzogeni izvori, odnosno spoljašnji uticaji koji pospešuju ili izazivaju njihovu povećanu produkciju. Neki od njih su: duvanski dim, konzumacija alkohola, nagla i intenzivna fizička aktivnost, pojava avitaminoze, pojedini lekovi, radioaktivnost, UV zračenje, joni

toksičnih metala, pesticidi, organski rastvarači, izduvni gasovi, ozon i drugi kontaminanti životne sredine (McCall i Frei, 1999).

Tabela 2.5 Reaktivne vrste u organizmu (Halliwell, 2006)

Slobodni radikali	Neradikalski oblici
<i>Reaktivne kiseonične vrste (ROS)</i>	
superoksid anjon radikal, $O_2^{\bullet-}$	Vodonik peroksid, H_2O_2
hidroksil radikal, OH^{\bullet}	hipobromna kiselina, $HOBr$
hidroperoksil radikal, HOO^{\bullet}	hipohlorna kiselina, $HOCl$
karbonatni radikal, $CO_3^{\bullet-}$	ozon, $O_3^{\#}$
peroksil radikal, RO_2^{\bullet}	singlet kiseonik, $^1\Delta gO_2$
alkoksil radikal, RO^{\bullet}	Organski peroksidi, $ROOH$
ugljendioksid radikal, $CO_2^{\bullet-}$	peroksinitrit, $ONOO^-$
singlet kiseonik, $^1\Sigma g^+O_2$	peroksinitrat, O_2NOO^-
	peroksinitritna kiselina, $ONOOK$
	peroksimonokarbonat, $HOOCO_2^-$
	nitrozoperoksikarbonat, $OMOOCO_2^-$
<i>Reaktivne vrste hlora (RCS)</i>	
atomski hlor, Cl^{\bullet}	hipohlorna kiselina, $HOCl$
	nitril hlorid, NO_2Cl
	Hloramini
	molekulski hlor, Cl_2
	brom-hlorid, $BrCl$
	hlor-dioksid, ClO_2
<i>Reaktivne vrste broma (RBS)</i>	
Atomski brom, Br^{\bullet}	hipobromna kiselina, $HOBr$
	molekulski brom, Br_2
	brom-hlorid, $BrCl$
<i>Reaktivne vrste azota (RNS)</i>	
azot-monoksid, NO^{\bullet}	Nitritna kiselina, HNO_2
azot-dioksid, $NO_2^{\bullet\#}$	nitrozil katjon, NO^+
nitrat-radikal, NO_3^{\bullet}	nitroksil anjon, NO^-
	Dinitro tetroksid, N_2O_4
	Dinitro trioksid, N_2O_3
	peroksinitrit, $ONOO^-$
	peroksinitrat, O_2NOO^-
	peroksinitritna kiselina, $ONOOH^-$
	nitronijum katjon, NO_2^+
	alkil peroksinitriti, $ROONO$
	alkil peroksinitrati, RO_2ONO
	nitril hlorid, NO_2Cl
	peroksiacetil nitrat, $CH_3C(O)OONO_2^{\#}$

[#] oksidujući agensi iz zagađenog vazduha toksični za ljude i životinje

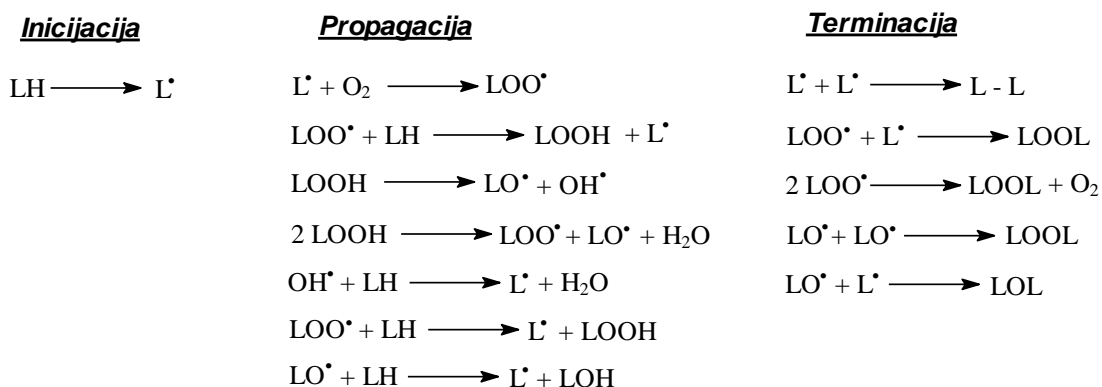
Joni prelaznih metala imaju centralnu ulogu u produkciji kiseoničnih slobodnih radikala u živim organizmima. Gvožđe se javlja u dva oksidaciona stanja – Fe^{3+} i Fe^{2+} . Fe^{3+} je relativno biološki inaktivna forma gvožđa, koja može biti redukovana u aktivnu formu (Fe^{2+}), zavisno od

uslova, naročito pH (Strlic i drugi, 2002), ili u prisustvu superoksid anjon radikala (Haber-Weiss-ova reakcija) (Kehrer, 2000). Ponovna oksidacija Fe^{2+} odvija se Fenton-ovom reakcijom, uz produkciju hidroksil radikala (Strlic i drugi, 2002).

2.4.1.1 Uloga i toksično delovanje RS u organizmu

Reagujući sa primarnim biomolekulima, RS dovode do promena u strukturi i funkciji ovih jedinjenja (McCall i Frei, 1999). Ove interakcije nisu nužno štetne, već su naprotiv, nekada i korisne. Tako npr. neki RS direktno učestvuju u borbi protiv različitih infekcija, u procesu fagocitoze, u inflamatornom odgovoru organizma na strane agense (Halliwell, 2006), u prenosu nervnih impulsa, u mehanizmima enzimske katalize (učesće $\text{O}_2^{\bullet -}$ u reakcionom mehanizmu indolamin dioksigenaze), u regulaciji i inhibiciji respiracije i apoptoze mitohondrija (Groves, 1999). ROS aktiviraju transkripcione faktore NF- κ B, AP-1, Sp1, za koje se zna da su usko povezani sa inflamacijom i starenjem (Lavrovsky i drugi, 2000). Azot-monoksid, jedan od najmanjih biološki aktivnih molekula, takođe ima širok spektar fizioloških funkcija. On reguliše srčani ritam, tonus krvnih sudova, protok i pritisak krvi (njegova povećana količina dovodi do vazodilatacije i hipotenzije, dok nedovoljna količina može biti uzrok hipertenzije), igra važnu ulogu u procesu zgrušavanja krvi, uključujući inhibiciju agregacije i adhezije trombocita i inhibiciju adhezije neutrofila za trombocite i vaskularni endotel, deluje kao neurotransmiter (u procesu učenja i pamćenja, reguliše ciklus spavanja), inhibira proliferaciju tumorskih ćelija i mikroorganizama (Virgili i drugi, 1998), dovodi do terminacije procesa lipidne peroksidacije, jer gradi stabilne proizvode sa lipidnim radikalima (L^{\bullet} , LO^{\bullet} , LOO^{\bullet}), itd.

Međutim, interakcije RS sa osnovnim ćelijskim strukturama i biomolekulima u organizmu dovode i do velikog broja štetnih efekata (Kohno, 2010). Tako, kiseonični radikali mogu inicirati oksidaciju i degradaciju nezasićenih masnih kiselina, koje predstavljaju strukturne komponente fosfo- i sfingolipida ćelijskih membrana, pri čemu dolazi do lipidne peroksidacije (LP) (Haraguchi i drugi, 1995; Mimica-Dukić, 1997). Lipidna peroksidacija se odvija slobodno-radikalnim mehanizmom i rezultuje oštećenjem ćelija i tkiva. Takođe, LP dovodi do kvarenja hrane koja u sebi sadrži polinezasićene masne kiseline. Hidroksilni radikal (OH^{\bullet}) najčešće započinje LP, međutim i pojedini drugi radikali (HO_2^{\bullet} , RO^{\bullet} , RO_2^{\bullet}) mogu pokrenuti ovaj proces. Reakcije LP odvijaju se u tri faze: inicijacija, propagacija i terminacija (Slika 2.27.) (Mimica-Dukić, 1997).



Slika 2.27. Reakcije lipidne peroksidacije

U fazi inicijacije, dolazi do apstrakcije protona sa C atoma u položaju α u odnosu na dvostruku vezu nezasićene masne kiseline, od strane reaktivnog slobodnog radikala. Ovo rezultuje formiranjem slobodnog ugljenik-centriranog radikala sa konjugovanim dvostrukim vezama (L^{\bullet}), koji je izrazito nestabilan kratkoživeći intermedijer. Stabilizacija ovog intermedijera može se

odvijati apstrakcijom vodonikovog atoma sa novog molekula masne kiseline, ili reakcijom sa triplet kiseonikom, pri čemu nastaje lipidni peroksil radikal (LOO[•]). Ovaj radikal dalje može reagovati sa sledećim molekulom polinezasićene kiseline dajući lipidni hidroperoksid (LOOH) i novi reaktivni L[•] koji dalje nastavlja lančanu reakciju (faza propagacije). U završnoj fazi LOO[•] i L[•] se transformišu u neradikalna jedinjenja – ugljovodonike, aldehide, alkohole, isparljive ketone i lipidne polimere, od kojih su neki veoma štetni (Laguette i drugi, 2007). LP dovodi do promena u funkciji i osobinama ćelijske membrane, koje se najviše odražavaju na selektivnu permeabilnost, receptorsku aktivnost i aktivnost membranskih enzima, transport jona, molekulska uređenost i fluidnost, što sve zajedno dovodi do disfunkcije ćelijske membrane (Halliwell i Gutteridge, 1985; Scandalios, 1993; Yen i Hsieh, 1998). Oštećenje membrane lizozoma izaziva ekskreciju hidrolitičkih enzima, što dovodi do razaranja osnovnih ćelijskih struktura i nagomilavanja lipofuscina, pigmenta starenja (Halliwell i Gutteridge, 1985; Hippeli i Elstner, 1999).

Slično lipidima i proteini su podložni oksidativnoj degradaciji pod dejstvom RS-a. Mnoge proteinogene aminokiseline podležu trajnoj promeni strukture pri oksidaciji (npr. triptofan se lako i brzo unakrsno povezuje formirajući dimer, a histidin, lizin, prolin, arginin i serin se oksidacijom prevode u karbonilne analoge) (Davies i Delsignore, 1987). Zatim, oksidacija proteina alkoksil radikalima dovodi do stvaranja drugih reaktivnih vrsta (protein-hidroperoksida) (McCall i Frei, 1999). Aktivirani kiseonik može oduzeti H-atome od cisteina (pri čemu nastaju tiol-radikali, koji međusobnim reakcijama grade disulfidne mostove) ili se vezati za ostatak metionina formirajući derivate sumporoksida. Sve ovo dovodi do disfunkcije enzima i drugih proteinskih biomolekula, kao i do poremećaja u transmembranskom i jonskom transportu (McCall i Frei, 1999).

2.4.1.2 Antioksidansi i određivanje antioksidantnog potencijala

U toku evolucije aerobnih organizama, kao adaptivni odgovor na toksično delovanje ROS, razvili su se kompleksni mehanizmi zaštite od oksidativnih oštećenja. Osnovna uloga ovih mehanizama je da smanje količinu i nekontrolisano stvaranje RS. Delovanjem brojnih antioksidantnih sistema, koji su prisutni u skoro svim ćelijama, oštećenja ćelija i biomolekula se svode na minimum.

Prema prirodi i načinu delovanja antioksidansi se mogu podeliti na enzimске i neenzimске, a prema poreklu mogu biti endogeni (sintetisani *in vivo*) i egzogeni (uneti putem hrane ili lekova). Od enzima koji učestvuju u antioksidantnoj zaštiti (primarna linija odbrane) najznačajniji su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GSHPx), glutation reduktaza (GSHR), glutation S-transferaze i peroksidaze (Px). Sekundarna linija odbrane obuhvata antioksidanse koji limitiraju oksidativne procese, sprečavaju inicijaciju ili prekidaju propagaciju lančanih slobodnoradikalnih reakcija. Karakteristično za ove antioksidanse je da pri znatno nižim koncentracijama od koncentracije supstrata smanjuju ili sprečavaju njegovu oksidaciju (Halliwell i Gutteridge, 2007). Ovde spadaju neenzimska antioksidantna jedinjenja, koja mogu biti:

- endogeni proizvodi ćelija (transferin i ceruloplazmin koji imaju važnu funkciju u transportu jona metala, redukovani glutation, albumin, mokraćna kiselina, bilirubin, cistein, ubihinon, α -liponska kiselina, taurin i hipotaurin, tioredoksin)
- nutritivne egzogene supstance (tokoferoli (α , β i γ), vitamin A, askorbinska kiselina, karotenoidi, biljni fenoli, jedinjenja azota (alkaloidi, amini, aminokiseline i derivati hlorofila))
- sintetski antioksidansi (aditivi u hrani ili farmaceutski preparati)

Veoma važnu ulogu u zaštiti od posledica oksidativnog stresa imaju i reparacioni enzimi (tercijarna linija odbrane), koji učestvuju u ispravljanju nastalog oksidativnog oštećenja nukleinskih kiselina, proteina i lipida. Ovde spadaju proteolitički enzimi, fosfolipaza A2, klasična i fosfolipid-zavisna GSHPx, glikozilaze, endo- i egzonukleaze, DNK ligaze, DNK polimeraze (Sevanian i Kim, 1985).

Egzogene supstance sa antioksidantnim delovanjem mogu biti unete u organizam putem hrane ili putem dijetetskih suplemenata i lekova. U nekim novijim istraživanjima (Lee i Lee, 2006), pokazalo se da unošenje velike količine jednog antioksidansa u vidu dijetetskog suplementa nije korisno, već čak može biti i štetno, s obzirom da neki antioksidansi u velikoj koncentraciji i pod određenim uslovima mogu da deluju prooksidantno i kancerogeno. Mnogo veći protektivni efekat na zdravlje ima ishrana bogata raznovrsnim antioksidansima sa različitim mehanizmima delovanja. Ovo se objašnjava aditivnim i sinergističkim efektom između različitih antioksidanasa iz voća i povrća i manjom toksičnošću zbog manje koncentracije (Liu, 2004; Sakamoto, 2000).

Ishrana bogata snažnim antioksidansima, kao što su askorbinska kiselina, vitamin E, biljni fenoli, karotenoidi, može da ima preventivni efekat, ali i terapijsko dejstvo u slučaju bolesti povezanih sa oksidativnim stresom (Law i Morris, 1998; Boudet, 2007). U cilju ispitivanja uticaja različitih agenasa na nivo slobodnih radikala kako u hrani, tako i u biološkim sistemima, u proteklih pedeset godina razvijene su brojne *in vitro* i *in vivo* metode za određivanje antioksidantnog potencijala. Prema principu na kome su zasnovane, ove metode se mogu podeliti na: metode za određivanje sposobnosti hvatanja reaktivnih vrsta ($O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , ROO^{\bullet} , H_2O_2 , $HOCl$, NO , $ONOO^-$), metode za određivanje sposobnosti neutralizacije stabilnih radikala (DPPH $^{\bullet}$, ABTS $^{\bullet+}$, DMPD $^{\bullet+}$) i metode za merenje sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije (Sánchez-Moreno, 2002). Kod sve tri vrste metoda, najčešće se za detekciju rezultata koristi spektrofotometrija, a ređe hemiluminometrija, elektron-spin rezonantna (ESR) spektrometrija, gasna hromatografija, HPLC-MS. Model sistemi u kojima se izvode ove metode mogu biti vrlo jednostavni (homogeni hemijski rastvori), zatim složeniji (heterogeni sistemi – emulzije, lipozomi ili lipoproteini) i na kraju veoma složeni (ćelijske kulture, životinjski organizmi, čovečiji organizam) (Laguerre i drugi, 2010). Kao završna faza ispitivanja potencijalne primene nekog jedinjenja kao antioksidansa vrše se klinički testovi na ljudima.

Zbog velikog broja RS i raznolikosti u mehanizmima delovanja antioksidanasa, ne postoji univerzalna metoda za procenu ukupnog antioksidantnog potencijala neke supstance, već je neophodno kombinovati više metoda koje se zasnivaju na različitim principima. Danas postoji velika potreba za standardizacijom ovih metoda, kako bi poređenje rezultata iz različitih laboratorija bilo moguće (Sánchez-Moreno, 2002).

U ovom radu, za procenu antioksidantnog potencijala ekstrakata vrsta roda *Allium*, odabrane su sledeće metode: sposobnost hvatanja OH^{\bullet} (Babović i drugi, 2010), sposobnost hvatanja NO radikala (Green i drugi, 1982), sposobnost neutralizacije stabilnih DPPH $^{\bullet}$ (Sánchez-Moreno i drugi, 1998) i ABTS $^{\bullet+}$ radikala (Erel, 2004) kao i sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije (Aust, 1985). Sposobnost hvatanja OH^{\bullet} određena je ESR (elektronska spin rezonanca) spektrometrijskom metodom, dok su ostale četiri metode spektrofotometrijske. ESR metoda je odabrana kao jedna od najosetljivijih i najspecifičnijih tehnika za analizu slobodnih radikala (Olea-Azar i drugi, 2006). Naročita prednost ove metode je što matriks nema uticaja na rezultate, s obzirom da signal u ESR spektru daju samo paramagnetne supstance.

ESR spektroskopska tehnika se zasniva na detekciji procesa apsorpcije mikrotalasnog zračenja od strane nesparenih elektrona, kada se oni nađu u statičkom magnetnom polju. Hemijski sistemi sa nesparenim elektronima (paramagnetne supstance) mogu biti atomi, molekuli ili joni.

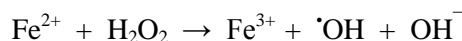
Nespareni elektron poseduje karakterističan spin (mehanički momenat) i njemu pridruženi magnetni momenat. Pod uticajem spoljašnjeg magnetnog polja, dolazi do cepanja energetskog stanja spina nesparenog elektrona na fine jasno definisane nivoe. Razlika u energiji između ovih nivoa proporcionalna je jačini magnetnog polja. Ako se ovaj sistem izloži još i delovanju elektromagnetnih talasa, i ako je energija kvanta elektromagnetnog talasa jednaka energetskoj razlici među nivoima, spin ima jednaku verovatnoću da se nađe u nekom od dozvoljenih nivoa, dakle, dolazi do rezonancije. ESR spektar se može snimiti menjanjem frekvencije primenjenog elektromagnetnog zračenja, dok se jačina magnetnog polja održava konstantnom, ili obrnuto. ESR merenja se najčešće izvode menjanjem jačine magnetnog polja pri konstantnoj frekvenciji (koja je obično u regionu mikrotalasa) (Savić, 2013). Kada se postigne rezonanciona frekvencija, nespareni elektroni počinju da apsorbuju energiju talasa i kreću se između energetskih stanja, aparat registruje ESR signal i konvertuje ga u spektar. ESR spektar je u stvari absorpcioni spektar mikrotalasa pri različitim jačinama magnetnog polja. Pik ili rezonantna linija javlja se na mestu gde je energija talasa ($\epsilon = h\nu$) jednaka razlici energija između spinskih stanja. Intenzitet pika proporcionalan je broju spinova, tj. količini slobodnih radikala. Na izgled ESR spektra utiče prvenstveno okolina elektrona, koja može da uzrokuje pomeranje signala od vrednosti za slobodan elektron, cepanje i razlike u intenzitetu spektralnih linija. Atomska jezgra koja imaju spinski kvantni broj različit od 0 ponašaju se kao mali magneti i postavljaju se paralelno ili antiparalelno u odnosu na pravac primenjenog magnetnog polja. Ukoliko se elektron nađe u takvoj okolini, na ESR spektru neće davati jedan signal (singlet) već će doći do cepanja signala, zbog kuplovanja spina elektrona sa spinom atomskih jezgara okoline. U zavisnosti od broja jezgara sa kojim se kupluje, elektron će na ESR spektru davati dublete, triplete, kvartete itd. U takvim slučajevima, razmak između spektralnih linija predstavlja jačinu interakcije između nesparenog elektrona i jezgra. Broj spektralnih linija u ESR spektru slobodnog radikala može biti veliki kod radikala koji sadrže veliki broj jezgara. Radikal može biti identifikovan na osnovu izgleda njegovog ESR spektra (Olea-Azar i drugi, 2006).

ESR tehnika je pogodna za detekciju slobodnih radikala u uzorcima hrane i drugim čvrstim uzorcima, praćenje oksidoredukcionih procesa i merenje kinetike slobodnoradikalnih reakcija. Antioksidantna aktivnost supstance se takođe vrlo lako određuje ovom tehnikom, na taj način što se meri smanjenje intenziteta signala u ESR spektru probe u koju je dodat antioksidans u odnosu na probu bez antioksidansa (kontrolu) (Kohno, 2010). U medicini se ova metoda koristi za detekciju slobodnih radikala nastalih u toku kancerogeneze i mutageneze u živim organizmima (Paolini i drugi, 1996; Liu i Shi, 2001).

ESR omogućava direktnu detekciju i kvantifikaciju slobodnih radikala uz uslov da su dovoljno stabilni i da im je vreme poluživota dovoljno dugo. U slučaju reaktivnih vrsta (RS) u hemijskim i biološkim sistemima, direktna detekcija uglavnom nije moguća zbog njihove visoke reaktivnosti i kratkog životnog veka (životni vek $\cdot\text{OH}$ je $\sim 10^{-9}$ s). Da bi se detektovali, koriste se hvatači spina ("spin trapping" agensi), čija je uloga da reaguju sa kratkoživećim radikalima, dajući time dugoživeće slobodne radikale koji se nazivaju spin adukti. Količina spin adukta proporcionalna je količini uhvaćenog radikala. Da bi neko jedinjenje bilo dobar hvatač spina, mora da bude dobro rastvorno i stabilno u vodi i da ima sposobnost da brzo i specifično reaguju sa slobodnim radikalima. Takođe je potrebno da produkovani spin adukt bude stabilan dovoljno dugo vremena, kao i da je njegov spektar pogodan za analiziranje (Kohno, 2010). Najčešće korišćeni hvatači spina za merenje kiseoničnih radikala su nitronska i nitrozo jedinjenja koja daju stabilne, detektabilne, nitroksidne spin adukte (Olea-Azar i drugi, 2006). Ovde spadaju: (2-metil-2- nitrozopropan (MNP), 3,5-dibromo-4-nitrozobenzen sulfonska kiselina (DBNBS), 5,5-imetilpirolin *N*-oksid (DMPO), fenil-*N*-*t*-butilnitron (PBN), 5-dietoksifosforil-5-metil-1-pirolin *N*-oksid (DEPMPO) i α -(4-piridil-1-oksid)-*N*-*tert*-butilnitron (POBN). Za praćenje $\cdot\text{OH}$ veoma je pogodan DMPO zbog relativno

niske cene i građenja stabilnog spin adukta sa $\cdot\text{OH}$, čiji ESR spektar se lako analizira (Kohno, 2010).

Osnovni princip ESR metode za određivanje antioksidantne aktivnosti neke supstance podrazumeva: generisanje radikala, njihovo hvatanje od strane hvatača spina, i određivanje relativne koncentracije spin adukta u prisustvu i odsustvu potencijalnog antioksidansa, merenjem površine pika u spektru (Babović i drugi, 2010). Za generisanje $\cdot\text{OH}$ radikala najčešće se koristi Fentonov sistem u kojem se upotrebljava gvožđe ili neki drugi prelazni metal:



Za ispitivanje uticaja biljnih ekstrakata ili jedinjenja izolovanih iz biljaka na intenzitet lipidne peroksidacije, do sada je razvijeno nekoliko metoda (Laguerre i drugi, 2007). Neke od ovih metoda zasnivaju se na praćenju koncentracije malondialdehida (MDA), jednog od proizvoda degradacije polinezasićenih masnih kiselina. Mogući načini za kvantifikovanje MDA su GC-FID nakon derivatizacije, HPLC sa DAD ili fluorimetrijskim detektorom i spektrofotometrijske metode. Zbog svoje jednostavnosti, najčešće se koristi spektrofotometrijska metoda koja se zasniva na reakciji MDA sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA test), pri čemu nastaju obojeni adukti. TBA test LP se može indukovati na različite načine (jonizujućim zračenjem, pomoću hemijskih agenasa - metalni joni, slobodni radikali, metaloproteini), a kao substrati se mogu koristiti slobodne nezasićene masne kiseline, lipozomi, različita masna ulja, LDL, homogenati jetre, hepatociti, telesne tečnosti itd (Mimica-Dukić i drugi, 2012). U ovom radu, za ispitivanje uticaja ekstrakata vrsta rod *Allium* na intenzitet LP primenjen je TBA test, kao supstrat je korišćeno laneno ulje zbog velikog sadržaja nezasićenih masnih kiselina, a LP je indukovana u Fe^{2+} /askorbat sistemu.

Mehanizmi delovanja neenzimskih antioksidanasa

Neenzimski antioksidansi ispoljavaju svoju aktivnost preko različitih mehanizama (Hoult i Paya, 1996; Primiano i drugi, 1997; Packer i drugi, 1999; Lebeau i drugi, 2000), kao što su: kompleksiranje jona metala (joni gvožđa ili bakra) i sprečavanje njihove katalitičke funkcije u formiranju RS; inhibicija enzimskih sistema koji produkuju RS; prevođenje reaktivnih slobodnih radikala u manje reaktivne oblike (hvatanjem – “skevindžer aktivnost” ili redukcijom (doniranjem elektrona ili H atoma)); prekid slobodnoradikalske reakcije (razgradnja hidroperoksida lipida nastalih u fazi propagacije lipidne peroksidacije); indukcija ekspresije gena odgovornih za sintezu antioksidantnih enzima; povećanje aktivnosti antioksidantnih enzima; sinergistički efekat sa drugim antioksidansima.

Mnogi biomolekuli biljaka (biljni fenoli, jedinjenja azota, jedinjenja sumpora, karotenoidi) ispoljavaju snažno antioksidantno delovanje.

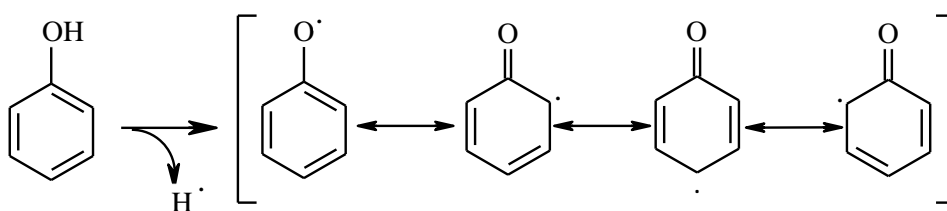
Sumporna jedinjenja mogu da deluju kao redukujući agensi doniranjem elektrona sa sumporovog atoma i reakcijom sa slobodnim radikalima, pri čemu ih prevode u stabilnije produkte i na taj način zaustavljaju lančanu slobodnoradikalnu reakciju. Pretpostavlja se da visokoj antioksidantnoj aktivnosti doprinose dvostruka veza alilne grupe vezane za sumporov atom (zbog mogućnosti rezonantne stabilizacije), kao i dužina alk(en)il grupe na S atomu. Jedinjenja iz grupe vinilditiina (3,4-dihidro-3-vinil-1,2-ditiin), koja nastaju termo-hemijskom transformacijom iz alicina, imaju znatno veću antioksidantnu aktivnost nego alifatični dialk(en)il disulfidi i trisulfidi. Takođe, na stepen antioksidantne aktivnosti utiče i broj sumporovih atoma u molekulu, pa tako tri- i tetrasulfidi ispoljavaju veću aktivnost od disulfida. Za razliku od fenolnih jedinjenja, koja uglavnom spadaju u grupu antioksidanasa sa vodonik-donorskim sposobnostima, organski sulfidi i sulfoksidi iz lukova reaguju sa $\cdot\text{OH}$ i $\cdot\text{OOH}$ radikalima dajući sulfokside i sulfone (Nishimura i drugi, 2000; 2004).

Biljni fenoli pokazuju širok spektar farmakoloških aktivnosti, od kojih se mnoge zasnivaju na njihovom snažnom antioksidantnom delovanju i visokoj sposobnosti hvatanja slobodnih radikala (Middleton i drugi, 2000). Antioksidantno delovanje polifenoli ispoljavaju i u hidrofilnim i u lipofilnim sistemima (Arora i drugi, 1998).

Smatra se da je antioksidantna aktivnost fenola prvenstveno rezultat njihove sposobnosti da budu donori vodonikovih atoma i kao takvi uklanjaju slobodne radikale, uz formiranje manje reaktivnih fenoksil radikala:



Povećana stabilnost fenoksil radikala pripisuje se delokalizaciji elektrona i postojanju više rezonantnih formi (Slika 2.28.). Sa povećanjem stabilnosti nastalog fenoksil radikala, povećava se mogućnost nastajanja rekombinantnih reakcija koje dovode do terminacije slobodno-radikalskih procesa.



Slika 2.28 Rezonantna stabilizacija fenoksil radikala

Pored efekta hvatanja slobodnih radikala, biljni fenoli mogu delovati i kao preventivni antioksidansi tako što ili heliraju jone prelaznih metala, sprečavajući njihovo katalitičko delovanje u produkciji ROS (Arora i drugi, 1998; Shahidi i Wanasundra, 1992) ili inhibiraju oksidativne enzime.

Antioksidantna aktivnost fenolnih kiselina i njihovih estara uglavnom zavisi od broja i rasporeda fenolnih hidroksilnih grupa u molekulu. Elektron-privlačna svojstva karboksilne grupe hidroksibenzoevih kiselina ima negativan efekat na H-donorsku sposobnost ovih jedinjenja. Tako monohidroksi benzojeve kiseline pokazuju antioksidantnu aktivnost samo ako je –OH grupa u *meta* položaju, jer su *orto* i *para* položaji pod uticajem elektron-privlačne karboksilne grupe. Jedino u slučaju hvatanja hidroksil radikala sve monohidroksi benzojeve kiseline su podložne hidroksilaciji jer je hidroksil radikal izrazito reaktivan. Povećanje broja hidroksilnih grupa u molekulu povećava reaktivnost fenolnih kiselina (Kawabata i drugi, 2002; Rice-Evans i drugi, 1996).

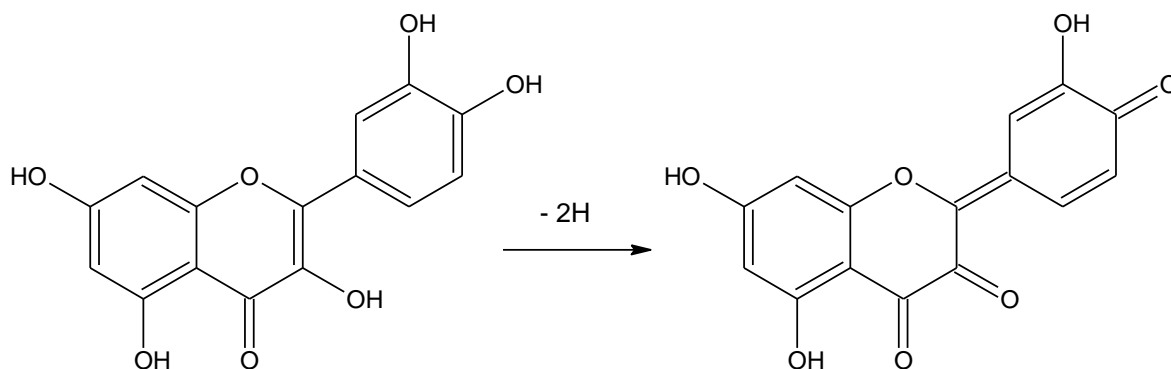
Derivati cimetine kiseline su efikasniji antioksidanti od derivata benzojeve kiseline, jer karboksilna grupa nema uticaj na hidroksilne grupe vezane za aromatični prsten. Pored toga, dvostruka veza iz –CH=CH–COOH grupe hidroksicinamata učestvuje u rezonacionoj stabilizaciji fenoksil radikala (Marinova i Yanishlieva, 2003).

Neke fenolne kiseline imaju i metal-helirajuća svojstva. Dokazano je da pri neutralnom pH, polifenoli sa 3,4-dihidroksi (kateholne) ili 3,4,5-trihidroksi (galoil) grupom, koje imaju elektron-donorske osobine, imaju sposobnost heliranja Fe^{2+} . Jedinjenja sa kateholnom funkcijom imaju veći helirajući kapacitet u odnosu na jedinjenja sa galoil grupom. Fenil propanoidi su bolji ligandi za gvožđe od derivata benzojeve kiseline, pa je očigledno da –CH=CH–COOH grupa ima uticaja na helirajuća svojstva. Supstitucija hidroksilne grupe metoksi grupom smanjuje helirajuće sposobnosti (Anđelković i drugi, 2006).

Flavonoidi imaju visok potencijal za hvatanje i neutralizaciju slobodnih radikala, zbog toga što doniranjem jednog H-atoma iz hidroksilne grupe daju flavonoid fenoksil radikal, koji je relativno stabilan zbog delokalizacije nesparenog elektrona i koji se dodatno stabilizuje otpuštanjem još jednog H-atoma sa susedne OH grupe, pri čemu nastaje neutralan molekul hinonske strukture. Pored toga, moguće su i reakcije kuplovanja između dva molekula flavonoid radikala (dimerizacija), ili između flavonoid radikala i slobodnog radikala koji je izazvao prvobitnu radikalsku reakciju (Rice-Evans i drugi, 1996).

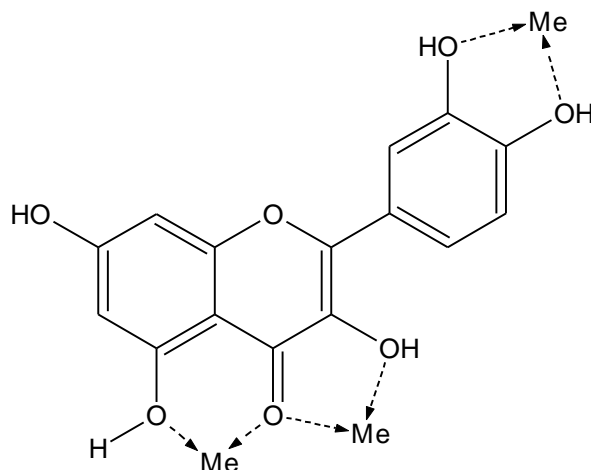
Mnogobrojne studije, koje su se bavile uspostavljanjem veze između strukture flavonoida i kapaciteta hvatanja slobodnih radikala, ističu da na lakoću doniranja H-atoma i lakoću stabilizacije i terminacije flavonoid aroksil radikala najviše utiču broj i raspored hidroksilnih grupa u molekulu (raspored je često važniji od broja), kao i to da li su hidroksilne grupe alkilovane ili glikozilovane (Rice-Evans i drugi, 1996; Seyoum i drugi, 2006). Glikozilacija ili metilacija onih hidroksilnih grupa, koje su potencijalnih reakcionih centri u radikalskim reakcijama, smanjuje antioksidantnu aktivnost flavonoida, dok glikozilacija ostalih hidroksilnih grupa u molekulu nema značajnijeg uticaja na antiradikalsku aktivnost (Rice-Evans, 1997). Iz ovoga se zaključuje da sposobnost hvatanja slobodnih radikala određuje samo aglikonski deo molekula. Na osnovu dosadašnjih rezultata može se zaključiti da su najaktivniji hvatači slobodnih radikala flavonoidi sa 3',4'-dihidroksi grupom u prstenu B i/ili 3-OH u prstenu C. Interesantno je da 2,3-dvostruka veza u prstenu C nije neophodna za visoku antiradikalsku aktivnost, ali da prisustvo 3-OH u prstenu C snažno pojačava RSC (Rice-Evans i drugi, 1996; Rice-Evans i drugi, 1997).

Kvercetin ima izrazito visok antioksidantni potencijal, jer sadrži i 3-OH/4-okso/ Δ_{2-3} u prstenu C i kateholnu grupu u prstenu B. Prvi H-atom donira se sa 3-OH grupe, a sledeći sa 4'-OH grupe (Slika 2.29). Prisustvo 2-3 dvostruke veze je izuzetno važno za visoku antioksidantnu aktivnost, jer ona stabilizuje fenoksil radikal nastao apstrakcijom H atoma sa 3-OH grupe, čak i u odsustvu 4-keto grupe. Glikozilacija 3-OH grupe kvercetina duplo smanjuje antioksidantni potencijal (Rice-Evans i drugi, 1996).



Slika 2.29. Oksidacija kvercetina

Pojedini flavonoidi imaju jako inhibitorno delovanje na procese peroksidacije lipida. Ovo delovanje može se zasnivati na njihovoj sposobnosti da heliraju jone bakra i gvožđa i time sprečavaju nastanak ROS ili sposobnosti hvatanja ROS (inicijatora LP) ili lipid-alkoksil i lipid-peroksil radikala. Metal-kompleksirajuća svojstva pokazuju flavonoidi koji imaju 3',4'-dihidroksi grupu u prstenu B ili 4-keto i 3-hidroksi grupu u prstenu C ili 4-keto u prstenu C i 5-hidroksi grupu u prstenu A (Slika 2.30.). Različiti metali imaju različit afinitet vezivanja za flavonoide (Rice-Evans i drugi, 1997).



Slika 2.30. Potencijalna mesta na flavonoidu za kompleksiranje metala

Mnogobrojna ispitivanja inhibitornog delovanja flavonoida na LP vršena su na modelima ćelijskih membrana. Na osnovu ovih istraživanja, pretpostavlja se da su kvercetin i drugi flavonoidi verovatno locirani na površini membrane, gde lako hvataju radikale iz vodene faze i na taj način sprečavaju inicijaciju LP.

2.4.2 Mutageneza

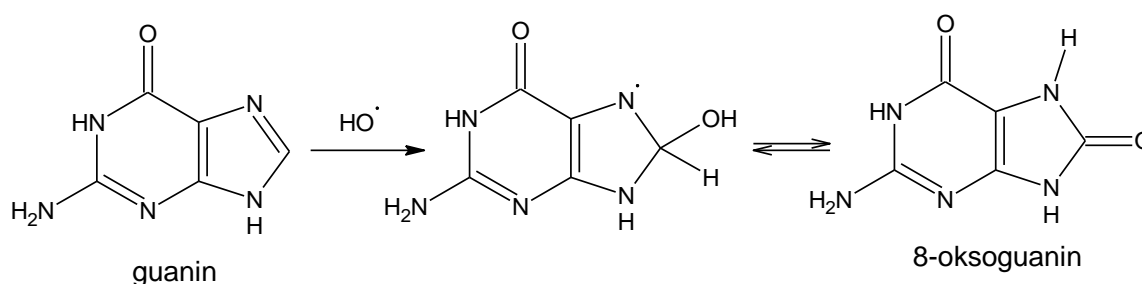
U jednoj ljudskoj ćeliji delovanjem različitih mutagenih agenasa nastane više od milion oksidativnih oštećenja DNK dnevno, koja ukoliko ne budu ispravljena delovanjem reparacionih enzima, dovode do mutacija i ćelijske smrti (Lodish i drugi, 2004). Mutagen je svaki fizički (jonizujuće i UV zračenje), hemijski (hemikalije koje reaguju sa DNK, bazni analozi, metali) ili biološki (virusi i bakterije) agens koji dovodi do promena na DNK molekulu, i na taj način povećava učestalost mutacija iznad normalnog nivoa. S obzirom da mnoge mutacije dovode do nastanka kancera, mutageni se obično smatraju i kancerogenima. Do sada je otkriven izrazito veliki broj hemijskih supstanci sa mutagenim delovanjem, od kojih su najčešći uzročnici mutacija ROS i RNOS, alkilujuć agensi, policiklični aromatični ugljovodonici i aromatični amini (Marnett, 2000). ROS i RNOS se generišu u toku normalnih procesa u ćeliji ili mogu biti produkovani od strane drugih hemijskih mutagena. Kod eukariota molekuli DNK locirani su u nukleusu da bi bili što udaljeniji od ćelijskih organela u kojima se produkuju RS.

U fiziološkim uslovima, ni superoksidanjon radikal ni H_2O_2 nisu u stanju da direktno oštete DNK, već su za to sposobni jedino hidroksil i alkoksil radikali, i singlet kiseonik (Cadenas, 1989). $\cdot\text{OH}$ može u organizmu da nastane iz H_2O_2 u Fentonovoj reakciji katalizovanoj metalnim jonima, dok alkoksil radikali ($\text{RO}\cdot$) takođe mogu biti generisani u Fentonovoj reakciji iz hidroperoksida (ROOH), npr. *t*-butil hidroperoksida (*t*-BOOH) (Simic i drugi, 1989). Pored toga, singletni kiseonik može da oksiduje guanin i da dovede do prekida jednostrukog lanca DNK (Sies i Menck, 1992). U prisustvu hidroksil radikala može doći i do kovalentnog povezivanja tipa timin-cistein između molekula DNK i proteina. Reakcijom $\cdot\text{OH}$ sa aromatičnim prstenom timidina nastaje timidil radikal, koji dalje podleže nizu sorednih reakcija dovodeći do oštećenja DNK i RNK.

Azot-monoksid ispoljava toksičnost uglavnom indirektnim putem, preko reaktivnih NO-vrsta (RNOS) u koje spadaju azot-trioksid (N_2O_3) i peroksinitrit (ONOO^-). RNOS nastaju u reakciji NO

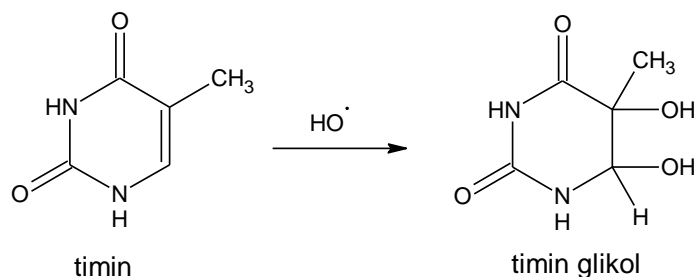
sa molekulskim kiseonikom ili superoksid-anjon radikalom, pri visokim koncentracijama NO (većim od $1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$). N_2O_3 dovodi do tzv. nitrozativnog stresa, kada dolazi do nitrozovanja amina, pri čemu mogu nastati kancerogeni nitrozamini, ili nitrozovanja tiola u proteinima, što može dovesti do inhibicije aktivnosti enzima ili do modulacije signalne transdukcije (Stadler i drugi, 1994). Takođe, N_2O_3 može dovesti i do deaminacije citozina, adenina i guanina (Wink i drugi, 1991). Peroksinitrit, s jedne strane može da generiše reaktivne HO^\bullet , a s druge strane protonacijom gradi peroksinitritnu kiselinu (ONO_2H) koja je izrazito reaktivna i može da oksiduje DNK nezavisno od sposobnosti da generiše $^\bullet\text{OH}$ (Marnett, 2000).

ROS i RNOS mogu da oksiduju obe komponente nukleotida (i šećernom komponentom i azotnom bazom) mehanizmom adicije ili apstrakcije H atoma, što dovodi do oštećenja DNK (Olinski i drugi, 2002). Oksidacijom i degradacijom azotnih baza nastaju brojni toksični produkti oksidacije, kao što su: 8-oksoguanin, 8-oksoadenin, timin glikol, 5-hidroksiuracil, uracil glikol, hidrosimetil urea i dr., dok oksidacija šećernih komponenti dovodi do cepanja dvostrukog heliksa DNK. Guanin najlakše podleže oksidaciji, pa je prevođenje guanina u 8-oksoguanin (oxo^8G) u reakciji sa $^\bullet\text{OH}$ najčešći tip oksidativnog oštećenja DNK (Slika 2.31.), koji je i najviše ispitivan zbog lake detekcije. Okso⁸G. 8-oksoguanin ima tendenciju sparivanja sa adeninom i dovodi do pojave G→T transverzija, koje su široko zastupljene u mutiranim onkogenima i tumor supresor genima (Matnett, 2000). Pored oxo^8G identifikovani su još mnogi drugi produkti oksidacije guanina (Bjelland i Seeberg, 2003).



Slika 2.31. Reakcija oksidacije guanina hidroksil radikalom

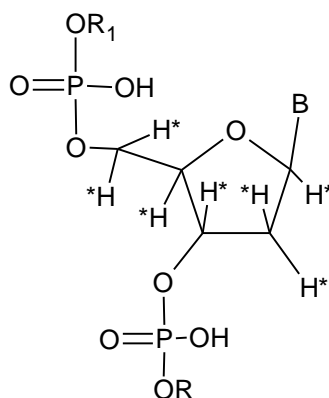
Prilikom oksidacije timina $^\bullet\text{OH}$ radikalom predmet napada može biti 5,6-dvostruka veza timina ili metil grupa u položaju 5. U prvom slučaju nastaje timin glikol koji dovodi do A:T→G:C tranzicija (Slika 2.32.) (Bjelland i Seeberg, 2003).



Slika 2.32. Reakcija oksidacije timina hidroksil radikalom

Adenin podleže reakcijama analognim reakcijama guanina, dajući 2-hidroksiadenin i 8-hidroksiadenin, dok citozin, slično kao timin daje citozin glikol i druge oksidacione produkte (Bjelland i Seeberg, 2003).

3-dezoksiriboza je jedna od glavnih meta napada RS u molekulu DNK. Ona ima sedam vodonikovih atoma koji mogu biti abstrahovani od strane nekog radikala ili nekog drugog jednoelektronskog oksidansa (*Slika 2.33.*). Apstrakcijom svakog od ovih H atoma nastaje čitav spektar specifičnih oksidacionih produkata (Pratviel i drugi, 1995). Među ovim proizvodima su i nekoliko reaktivnih elektrofila koji mogu da formiraju mutagene adukte sa DNK bazama i formiraju unakrsne veze (Dedon, 1998). Jedan od veoma toksičnih produkata je propenal azotne baze za koga je dokazano da je 30-150 puta reaktivniji u reakciji sa DNK od svog strukturnog analoga malonil dialdehida (MDA) (Plastaras i drugi, 2000). U toku procesa lipidne peroksidacije formiraju se takođe izrazito toksične reaktivne slobodnoradikalske vrste koje mogu reagovati sa DNK i izazvati različita oštećenja (Nappez i drugi, 1996).



Slika 2.33. Segment DNK na kome su prikazani vodonikovi atomi deoksiriboze (obeleženi *) koji mogu biti abstrahovani od strane oksidansa

Posledica reakcije ROS sa deoksiribozom dovodi do prekida lanca DNK, koji mogu biti jednolančani i dvolančani. Jednolančani prekidi mogu nastati kao direktna posledica dejstva slobodnih radikala ili mogu nastati u toku procesa reparacije DNK. Ukoliko se dva jednolančana prekida u naspramnim lancima nađu u blizini, u toku replikacije moguće je njihovo prevođenje u dvolančani prekid (Davydov i drugi, 2003). Ključni momenti u inicijaciji kancera su mutaciona aktivacija onkogeno ili inaktivacija tumor supresorskih gena (Kinzler et al., 1996; De Flora, 1998; Jackson et al., 1998; Loeb et al., 2000; De Flora i Ferguson, 2005). Oksidativno cepanje nukleinskih kiselina dovodi do oštećenja genoma (genotoksični efekat), što je uzrok mutageneze i kancerogeneze (Primiano i drugi, 1997; McCall i Frei, 1999).

2.4.2.1 Antimutageni i metode za ispitivanje antimutagenog potencijala

Antimutagenom se smatra svaki agens koji smanjuje frekvenciju indukovanih spontanih mutacija, bez obzira na mehanizam njegovog djelovanja (Kuroda, 1990). Cilj istraživanja antimutagenog delovanja je pronalaženje supstanci prirodnog porekla sa antigenotoksičnim i antimutagenim potencijalom, radi njihove potencijalne primene u primarnoj prevenciji bolesti uzrokovanih mutacijama, u koje spada i rak (Nikolić i drugi, 2012).

S obzirom na veliku raznovrsnost mogućih oštećenja DNK i kompleksnost puteva reparacije DNK, identifikacija mehanizama antimutageneze je veoma teška. Antimutageni mogu biti efikasni protiv jednog ili čitave klase mutagena, mogu delovati preko više različitih mehanizama, mogu čak

delovati i mutageno pri određenim koncentracijama ili u određenim sistemima za ispitivanje, što podrazumeva da treba pažljivo odabrati pristup istraživanju i pažljivo tumačiti rezultate (Nikolić i drugi, 2012). Mehanizmi preko kojih antimutageni mogu delovati obuhvataju sposobnost hvatanja RS, kompleksiranje jona metala (kao što su gvožđe i bakar) koji iniciraju radikalske reakcije, inhibiciju enzima odgovornih za generisanje slobodnih radikala, modulaciju aktivnosti enzima uključenih u metabolizam ksenobiotika, zaustavljanje aktiviranih mutagena, modulaciju DNK reparacije i regulaciju ekspresije gena (Berić i drugi, 2008).

Mnogobrojna ispitivanja pokazala su da mnogi sekundarni biomolekuli biljaka (fenoli, terpenoidi, sumporna jedinjenja) smanjuju rizik od nastanka malignih oboljenja i drugih bolesti povezanih sa mutacijama (Nikolić i drugi, 2012; Berić i drugi, 2008; Guyonnet i drugi, 2001). Dokazano je da je antioksidantna aktivnost ovih biomolekula usko povezana sa njihovim antimutagenim efektima (Ramos i drugi, 2003; Lee i Lee, 2006; Hayder i drugi, 2004).

Biljni fenoli kao snažni antioksidansi, inhibicijom produkcije RS i različitim mehanizmima neutralizacije slobodnih radikala u ćelijama, mogu da spreče oksidativna oštećenja DNK i pojavu tumora (Ohshima i drugi, 1998; Arora i drugi, 1998). S druge strane, ova jedinjenja mogu da modifikuju aktivnost enzimskih sistema uključenih u metabolizam ksenobiotika *in vivo*. Transformacija ksenobiotika u organizmu odvija se u mikrozomima jetre. Ovaj proces obuhvata dve faze u kojima učestvuju različiti enzimski sistemi označeni kao enzimi faze I i enzimi faze II. Faza I uključuje reakcije kao što su hidroliza, oksidacija, hidroksilacija, redukcija i dezaminacija ksenobiotika. U ovoj fazi ključnu ulogu imaju enzimi iz grupe oksidaza mešovite funkcije (MFO), od kojih je najznačajniji familija citohrom P450 enzima (CYP450). U drugoj fazi, metaboliti nastali u fazi I, podležu enzimskim reakcijama acetilovanja, metilacije ili konjugacije sa glukuronskom kiselinom odnosno sulfatnim anjonom, pri čemu molekuli postaju hidrofilni i izlučuju se iz organizma putem urina ili žuči. U toku biotransformacije u jetri mnogi ksenobiotici se transformišu u reaktivne oblike (aktiviraju se), koji reaguju sa molekulima DNK i izazivaju mutacije (Heo i drugi, 2001). Primer aktivacije ksenobiotika je biotransformacija policikličnih aromatičnih ugljovodonika (npr. benzopirena) u visokoreaktivne epoksidge koji veoma lako stupaju u reakcije sa molekulima DNK pri čemu dolazi do narušavanja strukture genetičkog materijala, što često dovodi do neoplastične transformacije ćelija i pojave kancerogeneze. Dokazano je da mnogi sekundarni metaboliti biljaka mogu inhibirati enzime faze I (CYP3A4) ili faze II (CYP2A2, 3A1, 2B2 i 2C6) i tako onemogućiti mutageni i kancerogeni uticaj ksenobiotika na organizam (Zhang et al., 1993; Block i Gyllenhaal, 2002). Za neke biljne fenole dokazano je da mogu inhibirati enzime MFO sistema i tako onemogućiti aktivaciju, odnosno mutageni i kancerogeni uticaj ksenobiotika na organizam (Zhang et al., 1993., Block i Gyllenhaal, 2002).

Za ispitivanje antimutagenog potencijala razvijene su mnogobrojne *in vitro* i *in vivo* metode. U *in vitro* testovima mogu se koristiti bakterijske ili eukariotske ćelije. Korišćenje testova na bakterijama se preporučuje za preliminarna ispitivanja, zbog toga što su veoma brzi i relativno jeftini, a daju mnogo informacija o ćelijskim mehanizmima antimutagenoze. Na osnovu rezultata ovih testova se može predvideti kako će neki agens delovati *in vivo*. Međutim, za pravu potvrdu antimutagenog potencijala neophodni su i testovi na ćelijama viših organizama, a naročito *in vivo* testovi na ćelijama sisara (Nikolić i drugi, 2012).

Za ispitivanje antimutagene aktivnosti nekog agensa naročito su pogodne mutantske bakterijske ćelije, kao što su mutanti *Escherichia coli* koji nemaju enzim superoksid dizmutazu zbog čega su naročito podložne mutacijama izazvanim delovanjem ROS, ili nemaju MutM(Fpg) glikozilazu koja uklanja oksidovanu bazu 8-oksguanin iz DNA, ili su deficitarne u MutY glikozilazi koja eliminiše pogrešno vezan adenin nasuprot 8-oksguanina. Pored toga, *E. coli*

mutanti koji nemaju *oxyR* gen (gen koji reguliše sintezu antioksidantnih enzima) su izrazito osetljivi na mutageni efekat oksidujućih agenasa (Martínez i drugi, 2000).

U ovom radu antimutagena aktivnost ekstrakata vrsta roda *Allium* određena je merenjem njihovog protektivnog delovanja na oksidativna oštećenja DNK i mutagenezu u bakteriji *Escherichia coli* WP2. Korišćen je reverzno-mutacijski test, koji se preporučuje za skrining oksidacionih mutagena (Green i Muriel, 1976). Kao test organizam korišćen je soj IC202 *trpE65 oxyR*/pKM101. Ovaj soj je *oxyR* mutant, koji zbog nedostatka *oxyR* gena nema sposobnost uklanjanja ROS i izrazito je osetljiv na oksidativni stres, pa je pogodan za detekciju antimutagenog potencijala antioksidanasa. OxiR protein (koji je kodiran *oxyR* genom) je redoks-senzitivni transkripcioni aktivator gena za sintezu antioksidantnih enzima (katalaza, hidroksiperoksidaza I, alkilhidroperoksid reduktaza, glutation reduktaza). IC202 sadrži takođe i plazmid pKM101 koji nosi *mucAB* gen visoko osetljiv na delovanje oksidacionih mutagena, kao i mutirani *trpE65* gen, zbog čega ne može da sintetiše triptofan. Na mutiranom *trpE65* genu triplet nukleotida CAA zamenjen je oker stop kodonom (TAA, eng. ocher) (Ohta i drugi, 2002). Originalni triplet nukleotida CAA kodira četvrtu amino kiselinu (glutamin) na N-terminusu antranilat-sintaze, enzima koji je neophodan za sintezu triptofana. Zbog toga za rast ovog soja na minimalnoj podlozi potrebna suplementacija triptofanom. Oksidativni mutageni aktiviraju *mucAB* gen, koji zatim pokreće reparacionu mutagenezu. U toku reverzije dolazi do supstitucije baza na baznom paru A:T, pri čemu se stop kodon (TAA) ponovo konvertuje u kodon za glutamin (CAA) ili alternativne kodone (lizin (AAA), glutaminska kiselina (GAA), leucin (TTA), serin (TCA) ili tirozin (TAC, TAT)), što omogućava sintezu antranilat-sintaze, a samim tim i sintezu triptofana, pa bakterije nastavljaju da rastu na podlozi koja ne sadrži Trp (Martinez i drugi, 2001). Mutageneza je praćena preko *trpE65*→Trp⁺ reverzije. Broj Trp⁺ revertanata proporcionalan je jačini oksidacionog mutagena, a obrnuto proporcionalan jačini antimutagenog agensa (Blanco i drugi, 1998; Urios i drugi, 1995). Kao jak oksidacioni mutagen koji indukuje oksidativni stres i pokreće reparacionu mutagenezu korišćen je *tert*-butil-hidroperoksid (*t*-BOOH), jer je stabilniji od vodonik-peroksida i otporan na delovanje katalaze (Urios i Blanco, 1996).

2.4.2.2 Potencijalno prooksidantno delovanje antioksidanasa i genotoksičnost

Delovanje većine hvatača slobodnih radikala zasniva se na reverzibilnim oksido-redukcionim reakcijama, zbog čega oni mogu da ispolje i antioksidantnu i prooksidantnu ulogu u zavisnosti od koncentracije reaktanata i uslova reakcije. Zbog toga antioksidansi, s jedne strane mogu delovati preventivno na kancerogenezu hvatajući ROS, a s druge strane produkcijom ROS mogu štetno delovati na DNK. Pored toga, neka polifenolna jedinjenja upravo zahvaljujući prooksidantnom delovanju deluju antikancerogeno, jer povećana produkcija ROS indukuje apoptozu u tumorskim ćelijama. Tako je za galnu kiselinu i epigalokatehingat dokazano da kada su prisutni u velikoj koncentraciji, proizvode H₂O₂. Zbog toga njihova upotreba kao dijetetskih suplemenata u relativno visokoj koncentraciji može rezultovati toksičnim i kancerogenim efektom. Takođe, epidemiološke studije ukazuju da je smanjeni rizik od nastanka kancera više vezan za ishranu bogatu raznovrsnim antioksidansima, nego za suplementaciju pojedinačnim antioksidansom (Lee i Lee, 2006).

Neki polifenoli mogu da proizvode ROS i u procesu autooksidacije u prisustvu metalnih jona. Autooksidacijom ova jedinjenja generišu semihinon radikal, koji podleže neenzimskoj redukciji sa NADH, što rezultuje produkcijom viška ROS (Long i drugi, 2000). Višak ROS može da indukuje apoptozu u kancer ćelijama, pa se može reći da i prooksidantni efekat polifenola doprinosi njihovoj antikancer aktivnosti.

Zbog svega navedenog, u okviru provere bezbednosti korišćenja nekog biljnog ekstrakta ili izolovanog jedinjenja kao dijetetskog suplementa, potrebno je proveriti njegovu genotoksičnost za koncentracije pri kojima ispoljava biološku aktivnost. Zbog toga je jedan deo istraživanja u ovom radu bio usmeren na određivanje genotoksičnog efekta ekstrakata vrsta roda *Allium*. Za određivanje genotoksičnog efekta korišćen je alkalni komet test, nazvan još i test elektroforeze pojedinačnih ćelija (SCGE – single cell gel electrophoresis), koji predstavlja jednostavnu, brzu i osetljivu tehniku za detekciju oštećenja na DNK molekulu na nivou pojedinačnih eukariotskih ćelija. Ova tehnika se često koristi za *in vitro* ispitivanje genotoksičnosti supstanci koje neposredno izazivaju oštećenja na DNK ili dovode do stvaranja alkalno labilnih adukata DNK. Dodatna prednost ovog testa u odnosu na druge testove za ispitivanje genotoksičnosti (izmena sestrinskih hromatida (SCE), hromozomske aberacije, mikronukleus test) je da nije potrebna prethodna deoba ćelija, pa se može koristiti i za ćelije koje se ne dele (Valverde i drugi, 2000). Na početku testa ćelije se prvo izlažu potencijalnom genotoksičnom agensu, koji može na nekoliko načina da ošteti DNK molekule: da izazove prekide na jednom ili oba lanca DNK, ili da dovede do stvaranja DNK adukata koji su alkalno labilni i pri visokom pH hidrolizuju stvarajući prekide na DNK. DNK prekidi dodatno mogu da nastanu i tokom nepotpune ekscizije reparacije oštećenja na DNK molekulu izazvanog delovanjem genotoksičnog agensa. Nakon izlaganja ćelija ovom agensu, vrši se liza ćelija i denaturacija DNK u alkalnim uslovima, a zatim elektroforeza. Nakon elektroforeze, neoštećeni spiralizovani molekuli DNK, koji su migrirali sporo, pod mikroskopom imaju sferan oblik. Nasuprot tome, prekinuti i odvijeni delovi DNK koji imaju negativan naboj, i koji su se u električnom polju kretali brže prema anodi u odnosu na neoštećene delove, pod mikroskopom imaju oblik komete, po čemu je ceo test i dobio ime. Oštećenja DNK se lako kvantifikuju uz pomoć kompjuterske analize, a za kvantifikaciju se upotrebljavaju različiti parametri. Najčešće se oštećenja izražavaju kao % DNK u repu komete. Za komet test se mogu koristiti sve vrste eukariotskih ćelija, uključujući ćelijske linije i ćelije koje su izolovane iz različitih tkiva.

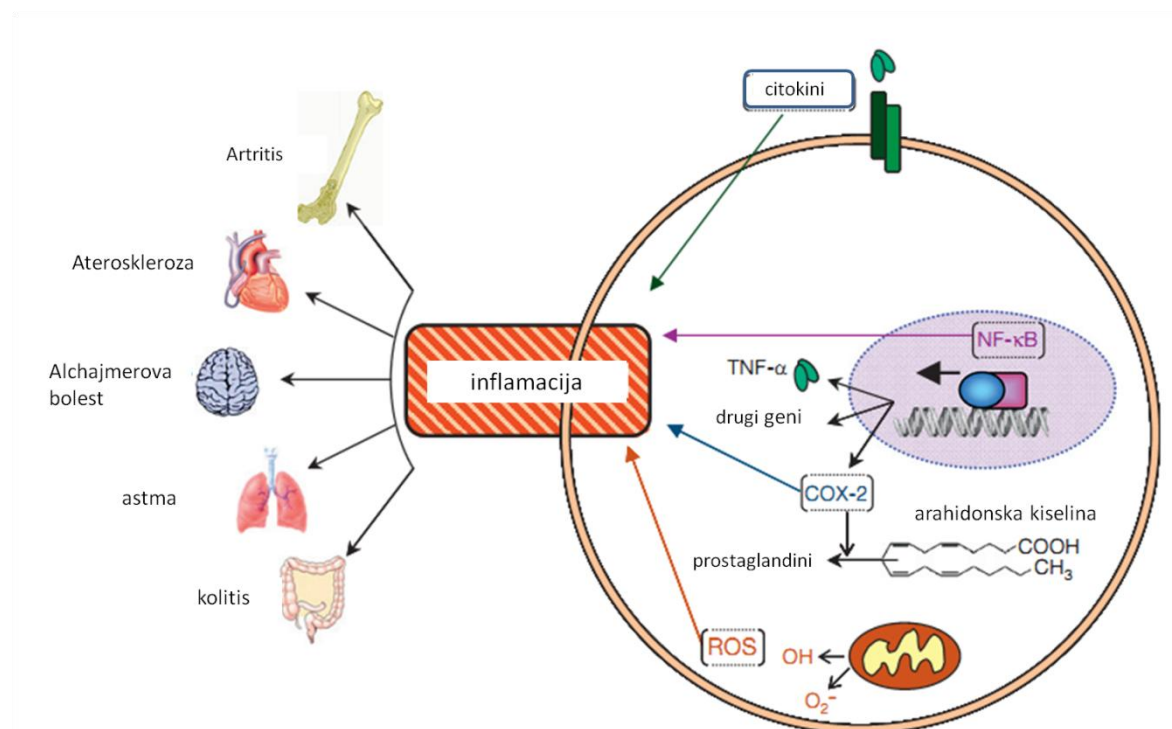
2.4.3 Inflamacija i medijatori inflamacije

Zapaljenje ili inflamacija je složen imunološki odgovor živog organizma na endogene i egzogene štetne faktore, koji obuhvata kompleksnu seriju reakcija u koje su uključeni nervni i endokrini sistem i hematopoezno tkivo. Ovi faktori obuhvataju patogene mikroorganizme, toksine, hemijske iritante, fizička oštećenja kao što su opekotine, promrzline, jonizujuće zračenje, mehaničke povrede, zatim autoimmune reakcije, poremećaji metabolizma itd. Cilj inflamacije je neutralizacija delovanja štetnog agensa, lokalizacija oštećenja i pokretanje reparacionih procesa organizma. Inflamacija se nalazi u osnovi kako prirodnog tako i adaptivnog imuniteta. Prirodni imunitet predstavlja prvu liniju nespecifičnu odbrane organizma od štetnog agensa, dok adaptivni (stećeni) imunitet podrazumeva adaptaciju imunog odgovora na određeni štetni stimulus i aktivira se tek nakon prepoznavanja štetnog agensa. U obe vrste imunog odgovora učestvuju immune ćelije, u koje spadaju fagociti (polimorfonuklearne ćelije (neutrofili, eozinofili i bazofili), monociti, mastociti, dendrociti, makrofage) i limfociti (T, B, NKT, $\gamma\delta$, i NK). U ovim ćelijama proizvode se inflamatorni medijatori (citokini, hemokini i komplemeni), koji imaju ulogu u regulaciji inflamatornog procesa (Prabhala i drugi, 2013; Jovanović i drugi, 1991). Medijatore inflamacije možemo da svrstamo u nekoliko biohemijski i funkcionalno različitih grupa: vazoaaktivni amini (histamin i serotonin), proteaze (sistem komplemenata, sistem zgrušavanja, sistem kinina i fibrinolitički enzimi), derivati arahidonske kiseline ili eikozanoidi (prostaglandini i leukotrieni), PAF (*platelet-activating factors* – trombocit-aktivirajući faktor), citokini (interleukini,

TNF), faktori rasta (PDGF, FGF, EGF itd.), NO i drugi biološki aktivni molekuli male molekulske mase (Damjanov i drugi, 2009).

Pored imunih ćelija i trombociti učestvuju u imunom odgovoru modulirajući zapaljenske reakcije. U njima se proizvodi mnoštvo inflamatornih medijatora (hemokina, interleukina i lipidnih medijatora), koji se sekretuju i imaju ulogu u mobilizaciji i aktivaciji leukocita (von-Hundelshausen i Weber; 2007).

Oblik, težina i tok zapaljenjskog procesa zavise od vrste i intenziteta štetnog agensa, vrste tkiva i opšteg stanja organizma. Inflamacija može biti akutna i hronična. Akutni zapaljenjski procesi mogu da se razviju veoma brzo po dejstvu štetnog agensa, odlikuju se jasnim zapaljenjskim znacima, traju oko tri nedelje i najčešće se završavaju regeneracijom. Kod hroničnih zapaljenjskih procesa, koji se javljaju kod perzistentnih infekcija, dugotrajnog izlaganja endogenim ili egzogenim štetnim agensima i usled autoimunih reakcija, dolazi do hiperprodukcije ćelija imunog sistema, enzima koji razaraju tkiva i inflamatornih medijatora, što sve dovodi do niza patoloških poremećaja (astma, reumatoidni artritis, osteoartritis, multiple skleroza, ateroskleroza, Alchajmerova bolest, kolitis) (Slika 2.34.) (Prabhala i drugi, 2013). Takođe, hronična ili ponavljajuća akutna inflamacija, kao rezultat infektivnih agenasa ili drugih uzroka, ima potencijalne promotivne funkcije u nastanku i progresiji tumora (Mohammadi-Motlagh i drugi, 2011).



Slika 2.34. Molekulski događaji koji prethode inflamaciji i veza između inflamacije i određenih bolesti. Razvoj zapaljenja je višefazan proces koji su uključeni brojni ćelijski medijatori. Kao spoljašnji signalni molekuli, citokini indukuju promene u ekspresiji i aktivnosti mnogih ključnih ćelijskih regulatora. Dolazi do aktivacije transkripcionih faktora, kao što je NF- κ B, koji pokreću sintezu proinflamatornih enzima, kao što su COX, LOX i iNOS, koji proizvode medijatore inflamacije (prostaglandine, RNOS). Tokom oksidativnog stresa, ROS direktno oštećuju ćelijske komponente i pokreću inflamaciju u različitim organima. Hronična inflamacija vodi nastanku bolesti kao što su artritis, ateroskleroza, Alchajmerova bolest, astma, kolitis (Prabhala i drugi, 2013).

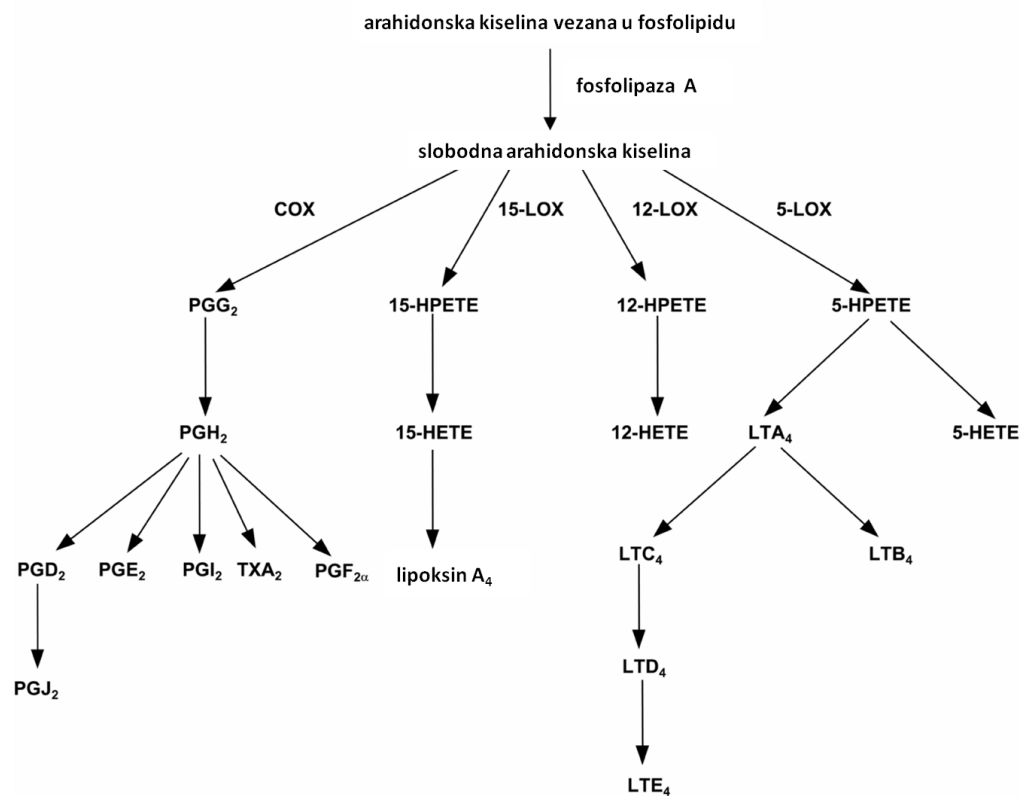
Azot oksid (NO) je jedan od važnih medijatora u inflamatornom odgovoru. Njegova dvojna uloga, kao korisnog i kao štetnog agensa mnogo je istraživana tokom poslednjih nekoliko decenija. Pored njegove esencijalne uloge kao signalnog molekula, NO u reakciji sa kiseonikom ili superoksid anjon radikalom generiše RNOS, koji su jako reaktivni i mogu da dovedu do oštećenja pa i do smrti ćelije. Koju od bioloških uloga će NO ispoljiti zavisi pre svega od njegove relativne koncentracije u ćeliji (Miranda i drugi, 2003). NO nastaje iz guanidino grupe L-arginina delovanjem nekog od tri poznata izotipa NO sintaze (NOS). Dva konstitutivna izotipa, kalcijum-zavisna (cNOS) i endotelna (eNOS) NO sintaza, generišu male količine NO dovoljne za ćelijsku signalizaciju, uključujući neurotransmisiju i vaskularnu relaksaciju. Treći izotip, inducibilna NO sintaza (iNOS), obično se ekspresuje u fagocitima kao odgovor na proinflamatorne stimuluse (toksični agensi (bakterijski endotoksin – LPS) ili proinflamatorni citokini - TNF- α , IFN- γ , IL1- β). Mala količina NO koju proizvodi eNOS u endotelnim ćelijama ima vazoprotektivni efekat, jer inhibira agregaciju trombocita, reguliše permeabilnost, adhezivnost i proliferaciju endotelnih ćelija i relaksaciju glatkih mišića. S druge strane, veće količine NO proizvedene delovanjem iNOS u makrofagama reaguju sa superoksid anjonom dajući peroksinitrit koji oksiduje LDL i dovodi do oštećenja tkiva i DNA. Aktivnost iNOS je regulisana pretežno na nivou transkripcije, gde NF- κ B igra ključnu ulogu u aktivaciji iNOS gena. NF- κ B (“nuclear factor *kappa* B”) predstavlja familiju transkripcionih faktora uključenih u ključne reakcije akutne inflamacije i imunog odgovora, a samim tim i u patogenezu inflamatornih bolesti. Pod normalnim uslovima NF- κ B nije aktivan jer je vezan za svoj proteinski inhibitor I- κ B. Međutim, u stanju oksidativnog stresa, ROS ili neki drugi proinflamatorni stimulus (TNF- α , LPS, viralna infekcija, UV radijacija, NO) aktiviraju I- κ B specifičnu protein-kinazu, koja vrši fosforilaciju I- κ B, a zatim i njegovu proteolizu, što dovodi do aktivacije NF- κ B. Ovako aktivirani NF- κ B se transportuje iz citoplazme u jedro, gde vrši aktivaciju ili represiju ekspresije gena koji kodiraju inflamatorne medijatore, ćelijske adhezivne molekule i regulatore ćelijskog ciklusa i apoptoze (Lavrovsky i drugi, 2000). NF- κ B aktivira ekspresiju proinflamatornih enzima kao što su ciklooksigenaze, lipoksigenaze i iNOS. S druge strane, eNOS je konstitutivni enzim i njegova aktivnost je regulisana prvenstveno intracelularnom koncentracijom Ca²⁺ na posttranslacionom nivou.

Eikozanoidi (prostaglandini, tromboksani, leukotrieni, 5-HETE i 12-HETE), su grupa biološki aktivnih jedinjenja koja se pod uticajem različitih fizičkih, hemijskih i hormonskih proinflamatornih stimulusa, sintetišu iz arahidonske kiseline i deluju kao medijatori inflamatornih procesa (*Slika 2.35.*). Sposobnost sinteze eikozanoida imaju sve ćelije ljudskog organizma osim eritrocita (Calder, 2005).

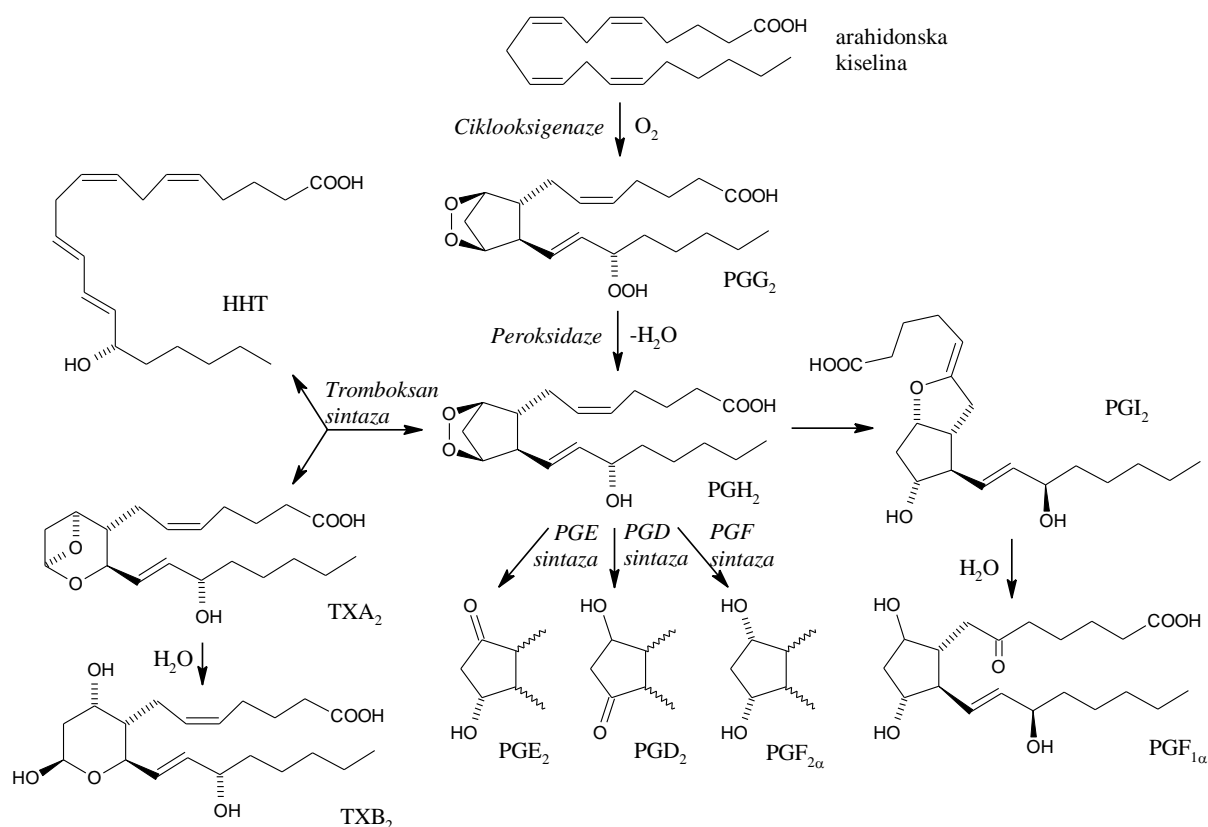
Arahidonska kiselina (5,8,11,14-eikosatetraen-kiselina), polinezasićena masna kiselina sa 20 C-atoma i tri, četiri ili pet dvostrukih veza. Arahidonska kiselina se unosi hranom ili može nastati iz esencijalne linolenske kiseline. U ćelijama se ova kiselina najčešće nalazi u esterifikovanom obliku, ugrađena u fosfolipide membrane, zbog čega sintezi eikozanoida prethodi njeno oslobađanje iz ovih estara. Oslobađanje arahidonske kiseline iz fosfolipida katalizuju fosfolipaze, najčešće intracelularna fosfolipaza A₂ (PLA₂), koja hidrolizuje estarsku vezu na drugom C atomu glicerolnog ostatka fosfolipida (Calder, 2005).

Prostaglandini (PG) i *tromboksani* (TX), koji pripadaju grupi eikozanoida, nastaju delovanjem ciklooksigenaze (COX) na arahidonsku kiselinu (*Slika 2.36.*). Ovaj enzim katalizuje oksidaciju arahidonske kiseline do odgovarajućeg hidroperoksi-endoperoksida – prostaglandina G₂ (PGG₂), a zatim redukuje PGG₂ do alkohola – PGH₂. Intermedijer PGH₂ je vrlo nestabilan i predstavlja mesto grananja u biosintezi različitih prostanoida. On je prekursor prostaglandina (PGD₂, PGE₂, PGF_{2 α}), prostaciklina (PGI₂) i tromboksana (TXA₂) (Marks i Furstenberger, 1999). Koja vrsta

prostaglandina će nastati zavisi od tipa ćelije. Tako monociti i makrofage proizvode velike količine PGE₂ i PGF_{2α}, neutrofili srednje količine PGE₂, dok mastociti proizvode PGD₂ (Calder, 2005).



Slika 2.35. Biosintetski putevi eikozanoida iz arahidonske kiseline. COX – ciklooksigenaza; LOX – lipoksigenaza; PG – prostaglandin; TX – tromboksan; LT – leukotrien; HPETE – hidroperoksieikosatetraenska kiselina; HETE – hidroksieikozatetraenska kiselina (Calder, 2005).



Slika 2.36. Biosinteza prostaglandina i tromboksana – ciklooksigenazni put (Marks i Furstenberger, 1999)

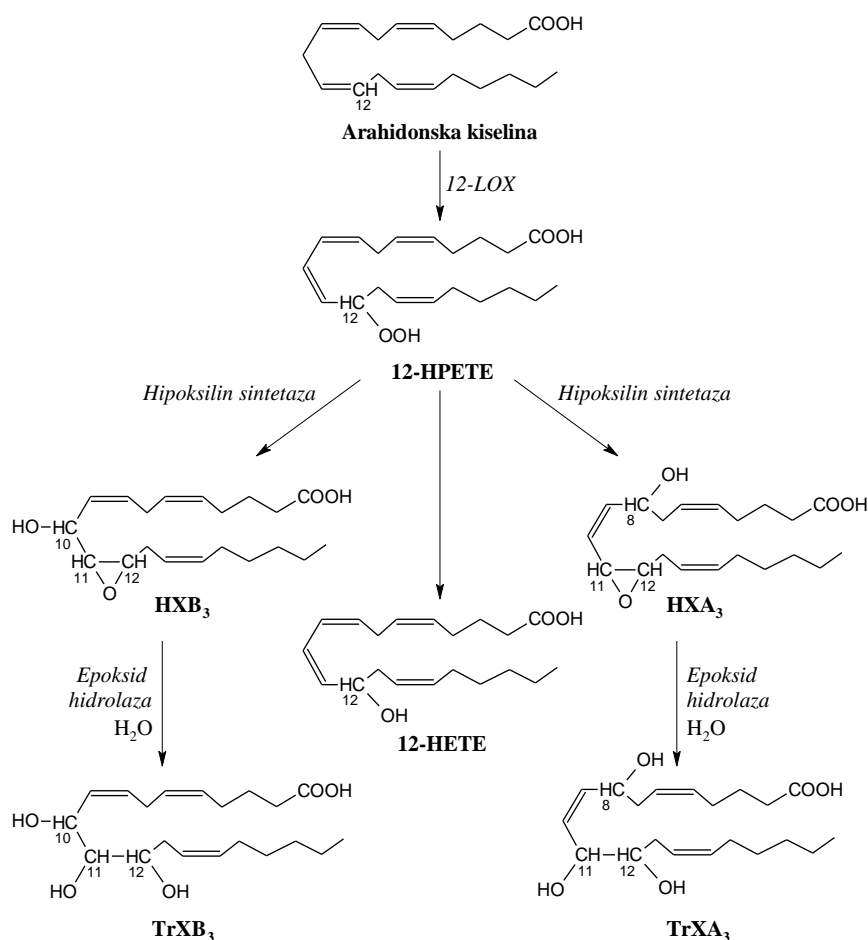
Tromboksani nastaju kao produkti delovanja tromboksan sintaze na PGH_2 (Slika 2.36.). Prvo nastaje TXA_2 , koji ima ulogu stimulatora vazokonstrikcije i agregacije trombocita, a iz njega se dalje formira TXB_2 , koji je praktično inaktivan. Kao sporedni proizvod u reakciji prevođenja PGH_2 u tromboksane nastaje ekvimolarna količina 12-hidroksiheptadekatrienske kiseline (12-HHT), kao i malonildialdehida (MDA). S obzirom da je količina nastalog 12-HHT direktno proporcionalna aktivnosti COX, neke metode za određivanje inhibitornog potencijala različitih jedinjenja na aktivnost COX, zasnivaju se na merenju koncentracije 12-HHT (Beara i drugi, 2010).

COX postoji u dve izoforme – COX-1 i COX-2. COX-1 je konstitutivni enzim koji se ekspresuje u većini ćelija sisara. Ovaj enzim ima višestruke funkcije: sintetishe prostaglandine, prekursore tromboksana u trombocitima i prostaciklina u vaskularnom endotelu; regulišu agregaciju trombocita, putem vazodilatacije; regulišu protok krvi i glomerularnu filtraciju u bubrezima; štiti želudačnu mukozu od ishemije i oštećenja (Marks i Furstenberger, 1999). Nasuprot tome, inducibilna COX-2 ekspresuje se samo u određenim tipovima ćelija (sinoviociti, endotelijalne ćelije, hodrociti, osteoblasti, monociti, makrofage) pod dejstvom različitih inflamatornih stimulusa, kao što su citokini ($TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$, i $IL1-\beta$) i bakterijski endotoksin LPS. COX-2 je odgovorna za produkciju velike količine proinflamatornih PGs na mestu inflamacije (Raso i drugi, 2001). Aktivnost COX-2 je takođe regulisana i delovanjem mitogena, tumor-promotera i faktora rasta, i dokazano je da je prekomerno ekspresovana u skoro svim premalignim i malignim ćelijama debelog creva, jetre, pankreasa, dojke, pluća, bešike, kože, želuca, glave, vrata i jednjaka. Zavisno od vrste stimulusa i tipa ćelije, nekoliko transkripcionih faktora, uključujući AP-1, NF- κ B, NF-IL-6, mogu da stimulišu COX-2 transkripciju, zbog čega su sva jedinjenja koja supresuju ove transkripcione faktore potencijalni inhibitori ekspresije COX-2 (Aggarwal i drugi, 2006). Ključna strukturna razlika u aktivom centru COX-1 i COX-2 je izmena Ile523 iz COX-1

valinom Val523 u COX-2. Ova varijacija proširuje hidrofobni džep u COX-2 izoenzimu, što je iskorišćeno u dizajnu COX-2 selektivnih lekova (Kurumbail i drugi, 1996).

Leukotrieni (LT) nastaju iz arahidonske kiseline delovanjem 5-lipoksigenaze (5-LOX). Lipoksigenaze su enzimi koji uvode kiseonik u polinezasićene masne kiseline, na pozicijama 5, 8, 12 ili 15, na osnovu čega je izvršena klasifikacija na 5-LOX, 8-LOX, 12-LOX i 15-LOX. Primarni produkti ovih klasa enzima su 5-, 12- i 15-hidroperoksieikozatetraenske kiseline (HPETEs). Nastali HPETEs se dalje redukuju do odgovarajućih hidroksieikozatetraenskih kiselina (HETEs), ali mogu biti prekursori za nastanak i drugih klasa sekundarnih lipidnih medijatora kao što su lipoksini, hipoksilini i trioksilini. Delovanjem 5-LOX prvobitno se formira nestabilni intermedijer leukotrien A_4 (LTA_4), od koga dalje nastaju LTB_4 i LTC_4 . LTC_4 daje LTD_4 , koji je izuzetno fiziološki aktivan, a iz njega se hidrolizom bočnog niza dalje formira znatno manje aktivan LTE_4 . Leukotrieni se sintetišu u polimorfonuklearnim leukocitima, mastocitima i makrofagama i imaju važnu ulogu u raznim imunološkim poremećajima i inflamatornim procesima, od kojih su naizraženije alergije i astma (Marks i Furstenberger, 1999).

12-LOX katalizuje sintezu prevođenja arahidonske kiseline u 12-hidroperoksieikozatetraensku kiselinu (12-HPETE), koja je prekursor za sintezu 12-hidroieikozatetraenske kiseline (12-HETE), hipoksilina A_3 i B_3 (HXA_3 , HXB_3) i trioksilina A_3 i B_3 ($TrXA_3$, $TrXB_3$) (Slika 2.37.). Kod čoveka postoje trombocitna i epidermalna 12-LOX, koje se razlikuju po stereohemiji reakcije koju katalizuju (Wong i drugi, 2001). Trombocitna 12-LOX katalizuje reakciju formiranja 12(*S*)-izomera, dok epidermalna vodi nastanku 12(*R*)-izomera. 12(*S*)-LOX je prekomerno ekspresovana u tkivima mnogih tumora (prostate, pankreasa, dojki, debelog creva i pluća) (Nie i Honn, 2002). Smatra se da ovaj enzim ima veliku ulogu u proliferaciji tumorskih ćelija. Takođe, 12-HETE pospešuje adheziju tumorskih ćelija, invaziju i metastazu tumora, i to tako što povećava motilitet tumorskih ćelija, sekreciju proteinaze i angiogenezu (Wong i drugi, 2001).



Slika 2.37. 12-Lipoksigenazni put metabolizma arahidonske kiseline. HETE-hidroksieikozatetraenoat; HPETE-hidroperoksieikozatetraenska kiselina; HX-hipoksilin; Tr-trioksilin

Inflamacija je često i jedan od etioloških faktora kardiovaskularnih bolezni, gde centralnu ulogu zauzima oksidovani LDL. Oksidaciju LDL pokreću lipoksigenaze, mijeloperksidaza i NO sintaze. 12 i 15-lipoksigenaze iz endotelijalnih ćelija i monocita/makrofaga, konvertuju arahidonsku kiselinu u lipidne hidroperokside koji oksiduju LDL. Hiperglikemija izaziva povećanu ekspresiju 12-lipoksigenaze. Mijeloperksidaza, koju sekretuju aktivirani fagocititi, generiše RS (hipohlornu kiselinu (HOCl), hloramine, tirozil radikale i azot dioksid (NO₂)), koji oksiduju lipide i proteine iz LDL. Veće količine NO proizvedene delovanjem iNOS reaguju sa superoksid anjonom dajući peroksininitrit koji oksiduje LDL. Oksidovani LDL stimuliše adheziju i agregaciju trombocita smanjenjem endotelijalne produkcije NO, povećanjem produkcije PGI₂, i stimulacijom sinteze prostaglandina i prekursora prostaglandina (Mertens i Holvoet, 2001), što sve pokreće razvoj inflamacije i dovodi do oštećenja ćelija i tkiva vaskularnog sistema i ubrzava ateroskleroza. Pored oksidacije LDL, povećana ekspresija 12-lipoksigenaze dovodi do povećane produkcije 12-hidroksieikozatetraenske kiseline (12-HETE), što rezultuje povećanom adhezijom monocita za endotelijum i doprinosi nastanku ateroskleroze (Mertens i Holvoet, 2001). Inhibitori lipoksigenaze, mijelopreoksidaze i iNOS bilo na translacionom ili posttranslacionom nivou, blokiraju oksidaciju LDL i smanjuju ateroskleroza, bez promene koncentracije holesterola, triglicerida i lipoproteina.

Danas je u upotrebi veliki broj antiinflamatornih lekova, koji se u zavisnosti od mehanizma delovanja, mogu podeliti u nekoliko grupa: inhibitori COX-1 i COX-2 (nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL) ili steroidni – glukokortikoidi), selektivni inhibitori COX-2 (iz klase NSAIL), inibitori 5-LOX, inhibitori LT receptora i inhibitori PLA₂. Glukokortikoidi inhibiraju delovanje

PLA₂ i sprečavaju oslobađanje arahidonske kiseline iz ćelijske membrane, pa je sinteza svih eikozanoida onemogućena (Rang i sar., 2004). Glukokortikoidi se koriste za supresiju različitih alergijskih, inflamatornih i autoimunih poremećaja i imaju izuzetno važnu terapijsku primenu u lečenju astme i kao imunosupresori pri transplantaciji organa. NSAIL mogu da deluju antiinflamatorno, analgetički i antipiretički. Većina tradicionalnih NSAIL (aspirin, ibuprofen, diklofenak) i glukokortikoida koji se danas primenjuju, nisu selektivni za COX-2, već inhibiraju istovremeno i konstitutivni COX-1 enzim, zbog čega mogu da izazovu niz neželjenih efekata. Selektivni NSAIL inhibiraju samo COX-2 i na taj način učestvuju u supresiji inflamacije. Tu spadaju sintetski lekovi celecoxib i rofecoxib (Rang i drugi, 2004) koji su se koristili za lečenje osteoartritisa, reumatoidnog artritisa, spondiloze, akutnog bola i bolnih menstruacija, međutim zbog brojnih štetnih efekata, posebno na kardiovaskularni system, izbačeni su iz upotrebe 2005. godine. Inhibitori produkcije TXA₂ (inhibitori tromboksan sintaze ili antagonisti TXA₂ receptora) su posebno značajni lekovi u lečenju bolesti kardiovaskularnog sistema i prevenciji metastaze tumora (Kontogiorgis i Hadjipavlou-Litina, 2010). Inhibitori enzima lipoksigenaznog puta, naročito inhibitori sinteze leukotriena, pronalaze najveću primenu u terapiji astme, alergija, psorijaze i artritisa (Charlier i Michaux, 2003; Werz i Steinhilber, 2005). U terapiji astme koriste se i inhibitori leukotrienskih receptora (Bernstein, 1998). Iako su do sada najbolje proučeni inhibitori sinteze leukotriena, sve je više saznanja o biološkom delovanju, zbog čega su istraživanja inhibitora 12-LOX i 15-LOX dobila na značaju.

S obzirom da svakim danom ima sve više novih saznanja o ulozi prostaglandina, lipoksina, 12-HETE, hipoksilina i triksilina u kancerogenezi i drugim patološkim stanjima vezanim za hroničnu inflamaciju, pronalaženje novih potentnih inhibitora COX i LOX enzima je od izuzetnog značaja i predstavlja veoma aktuelnu temu biohemijskih i medicinskih istraživanja (Ding i drugi, 2003). Sintetski lekovi imaju brojne štetne efekte, pa se sve više truda ulaže u pronalaženje COX i LOX inhibitora prirodnog porekla.

Do danas je ispitan veliki broj prirodnih proizvoda sa aspekta sposobnosti antiinflamatornog delovanja. Za galantamin i luteolin utvrđena je sposobnost inhibicije peroksidacije arahidonske kiseline. Pokazalo se da kvercetin i kurkumin pokazuju inhibitorno delovanje na PLA₂ u humanim leukocitima. Flavoni hrizin i apigenin i dihidrohalkon floretin, sprečavaju COX aktivnost, a time i agregaciju trombocita. 6-hidroksikemferol, kvercetagetin, 6-hidroksiluteolin i skutelarein inhibirali su COX aktivnost u leukocitima. Utvrđeno je i da katehin, epigalokatehin galat i rezveratrol inhibiraju ekspresiju COX-2 (Yoon i Beak, 2005). Bajkalein, eskuletin, gosipin i kvercetin pokazuju 12-LOX inhibitornu aktivnost (Schneider i Bucar, 2005). Kvercetin, galangin, apigenin, i naringenin značajno smanjuju oslobađanje PGE₂ i ekspresiju COX-2 u makrofagama (Raso i drugi, 2001). Flavonoli kemferol, kvercetin, miricetin i morin, neki neolignani, bajkalein i kurkumin pokazuju i znatnu 5-LOX inhibitornu aktivnost (Yoon i Beak, 2005).

Razvijen je veliki broj različitih *in vitro* metoda za ispitivanje inhibicije COX i LOX enzima, pri čemu su za neke napravljeni i komercijalni kitovi. U ovim metodama, kao izvor enzimske aktivnosti koriste se prirodni ili rekombinantni enzimi životinjskog ili humanog porekla, kao i različite ćelijske linije koje ekspresuju ove enzime. Arahidonska kiselina se često dodaje u reakcioni medijum i može da bude obeležena radioaktivnim izotopom. Načini indukcije inflamatornog odgovora se takođe razlikuju, pri čemu se najčešće koriste bakterijski lipopolisaharidi, neki citokini i tumor nekroza faktor. Enzimska aktivnost se može detektovati različitim tehnikama, kao što u hromatografske tehnike (TLC, HPLC-UV) i EIA (Mimica-Dukić i drugi, 2012).

U ovom radu, sposobnost ekstrakata roda *Allium* da inhibiraju COX-1 i 12-LOX ispitivana je u *ex vivo* metodi u kojoj su kao izvor COX-1 i 12-LOX enzima korišćene intaktne ćelije (humani

trombociti), a koncentracija metabolita arahidonske kiseline (12-HHT, TXB₂, PGE₂ i 12-HETE) određena LC-MS/MS tehnikom (Beara i drugi, 2010; Lesjak i drugi, 2013).

2.4.4 Kancer i ćelijska smrt

Kancer ili maligna neoplazija obuhvata grupu bolesti za koju je karakteristična nekontrolisana deoba ćelija uz odsustvo apoptoze, prodiranje u okolna tkiva (invazivnost), širenje po organizmu putem krvotoka i limfotoka i formiranje sekundarnih tumora (metastaza). Kancer nastaje kao posledica anomalija u genetskom materijalu jedne ćelije usled delovanja endogenih (nasledne mutacije, hormoni, imuni odgovori) i egzogenih faktora (pušenje, nepravilna ishrana, zračenje, infektivni agensi) (Anand i drugi, 2008).

Za održavanje homeostaze tkiva i sprečavanje nastanka kancera neophodno je da proces ćelijske smrti bude strogo regulisan. Poremećaji u regulaciji ćelijske smrti, pored kancera, dovode i do brojnih drugih patoloških stanja, kao što su šlog, infarkt miokarda, bolesti jetre, SIDA, autoimune i neurodegenerativne bolesti (Alzhajmerova, Parkinsonova, Hantingtonova bolest). Kod nekih od ovih bolesti javlja se nedovoljna apoptoza, dok se kod drugih javlja prekomerna apoptoza (Elmore, 2007; Kepp i drugi, 2011). S obzirom da za većinu ovih savremenih bolesti ne postoji adekvatna terapija, interes za pronalaženjem novih terapijskih strategija kako bi se modulirao proces ćelijske deobe i smrti je izuzetno porastao.

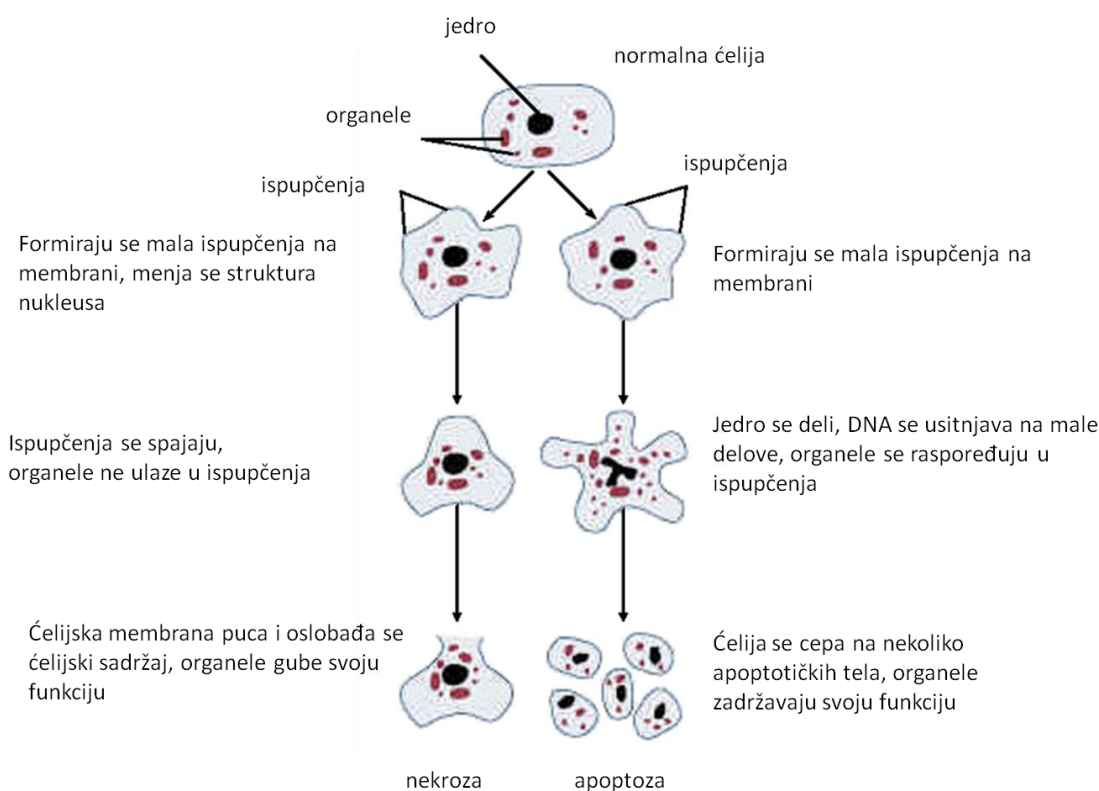
2.4.4.1 Tipovi ćelijske smrti

Do smrti ćelije može da dođe usled delovanja različitih patoloških faktora, kao što su fizički i hemijski agensi i mikroorganizmi, ili u situacijama nedostatka neophodnih hranljivih materija (npr. usled ishemije) kada nastupi nepovratno oštećenje ćelije. Međutim, pored smrti uzrokovane nekim spoljašnjim faktorom, postoji i fiziološka smrt ćelije, koja se javlja u toku embrionalnog razvoja i tokom obnove tkiva i organa odraslih jedinki. S obzirom da mehanizmi umiranja ćelija mogu biti različiti, izvršena je podela ćelijskih smrti na tipove na osnovu nekoliko kriterijuma. Prvi kriterijum su morfološke karakteristike, prema kojima ćelijska smrt može biti apoptotična, nekrotična, autofagična ili povezana sa mitozom. Drugi je enzimološki kriterijum prema kome se ćelijske smrti dele na one u čijem mehanizmu učestvuju enzimi nukleaze i specifične proteaze (kao što su kaspaze, kalpainsi, katepsini i transglutaminaze) i one kod kojih ovi enzimi nisu uključeni. Sa funkcionalnog aspekta ćelijska smrt može biti programirana ili slučajna, fiziološka ili patološka, dok prema imunološkim karakteristikama može biti imunološka i neimunološka (Melino, 2001). Kada se svi ovi kriterijumi uzmu u obzir, izdvajaju se tri osnovna tipa ćelijske smrti, a to su apoptoza ("suicidalna" ćelijska smrt), autofagija (ćelija „jede“ samu sebe) i nekroza (nasilna "akcidentalna" ćelijska smrt). Osnovna razlika među njima ogleda se u činjenici da su apoptoza i autofagija strogo regulisani procesi za čije odvijanje se troši energija, dok je nekroza pasivan tip ćelijske smrti, koji nastaje usled kolapsa ćelijskih homeostatskih mehanizama.

Apoptoza ili programirana ćelijska smrt tipa I je proces genski regulisane ćelijske autodestrukcije praćene fagocitozom, koja ima ulogu u održanju homeostaze tkiva u fiziološkim uslovima, ili se javlja kao odgovor na delovanje različitih toksičnih, zapaljenjskih i kancerogenih agenasa. Autofagija ili autofagocitoza (programirana ćelijska smrt tipa II) je genski kontrolisan katabolički proces u kome se ćelijski proteini i druge komponente organela razgrađuju lizozomalnim enzimima i recikliraju u cilju dobijanja energije i ponovne sinteze potrebnih biomolekula (Klionsky, 2007). Ovaj tip ćelijske smrti javlja se mnogo ređe u odnosu na apoptozu i

nekrozu, a karakteriše se pojavom velikog broja citoplazmatskih struktura sličnih vakuolama, poznatih kao autofagozomi, a javlja se kao odgovor na gladovanje, ili u toku razvoja i diferencijacije ćelija. Poremećena autofagija zapažena je kod velikog broja patoloških stanja, kao što su miopatije, neurodegenerativne bolesti, bolesti jetre i neki oblici kancera (Levine i Kroemer, 2008). Suprotno apoptozi i autofagiji, nekroza (ćelijska smrt tipa III) se javlja samo u patološkim uslovima usled abnormalnih stresova, kao što su ishemija, infekcija, hemijske ili fizičke povrede. Ćelije koje umiru mehanizmom nekroze ne šalju imunom sistemu odgovarajuće hemijske signale, koji bi pokrenuli fagocite da sprovedu fagocitozu nad mrtvim ćelijama, već dolazi do autolize ćelije praćene inflamacijom (Kroemer i drugi, 2005).

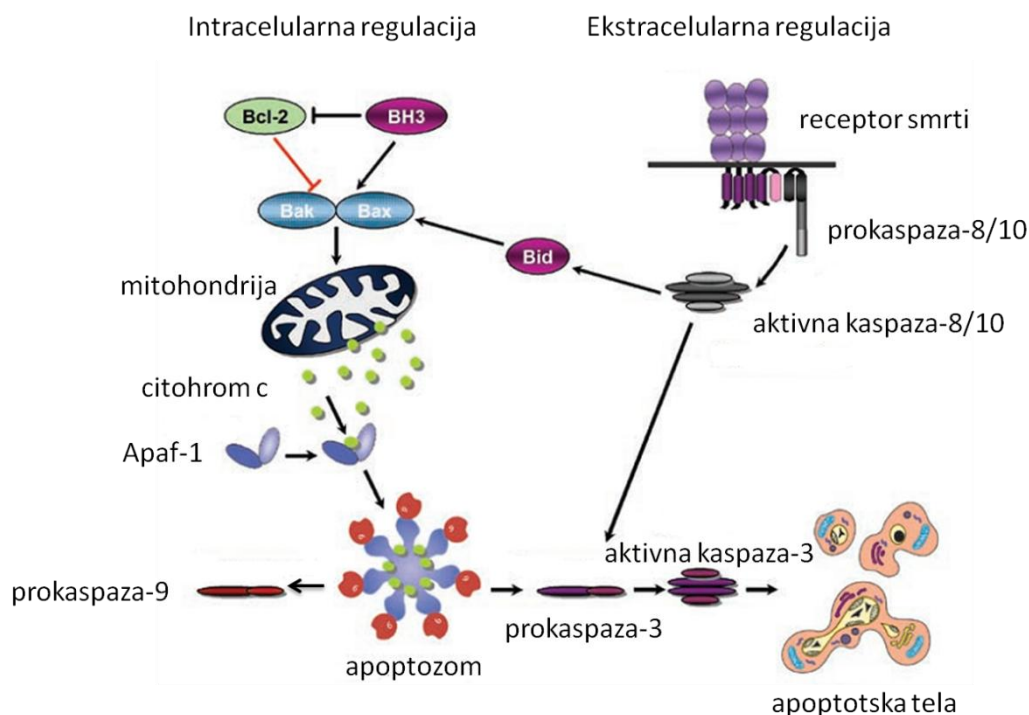
Apoptoza i nekroza se međusobno mogu razlikovati na osnovu morfoloških (Slika 2.38.) i biohemijskih karakteristika. Nekrozi prethodi formiranje reaktivnih kiseličnih vrsta i aktivacija neapoptotskih proteaza, što dovodi do gubitka funkcije jonskih pumpi i oštećenja membranskih lipida. Posledica ovih promena je porast jonske permeabilnosti plazma membrane, zbog čega ćelije bubre, raste koncentracija kalcijuma u citozolu, što izaziva preopterećenje mitohondrija kalcijumom. Kalcijum depolarizuje unutrašnju membranu mitohondrija i prekida proces produkcije ATP-a (Orrenius i drugi, 2003). Pored toga, proširuje se endoplazmatski retikulum, bubre i pucaju mitohondrije i lizozomi, razgradjuju se ribozomi, kondenzuje se hromatin, kidaju se membrane organela i na kraju puca ćelijska membrana (osmotska liza). Ćelijski sadržaj se izliva u okolna tkiva, šaljući hemotoksične signale imflamatornim ćelijama što rezultuje zapaljenjem (Kerr i drugi, 1972; Majno i Joris, 1995; Trump i drugi, 1997).



Slika 2.38. Morfološke razlike između apoptoze i nekroze

Apoptozu karakteriše stvaranje mehurastih ispuččenja na membrani, kondenzacija jedra i citoplazme (čime se zapremina ćelije smanjuje), raspodela organela po ispuččenjima i raspadanje ćelije na apoptotska tela koja bivaju fagocitovana. Ovaj proces je kontrolisan brojnim složenim signalnim putevima, koji mogu biti inicirani intracelularnim ili ekstracelularnim signalima (Slika

2.39.) (Schulze-Osthoff, 2008). Ekstracelularna inicijacija odvija se vezivanjem liganda, koga luče ćelije imunog sistema, za receptor smrti koji se nalazi na ćelijskoj membrani sa spoljne strane, što za posledicu ima aktivaciju inicijalnih kaspaza. Većina ćelijskih smrti, međutim, biva pokrenuta intracelularnim signalima. Neki od ovih signala aktiviraju pro-apoptotske proteine (npr. BH3 i Bax), koji zatim prave pore na spoljašnjoj membrani mitohondrija, što dovodi do izlaska citohroma c iz mitohondrija u citoplazmu. Citohrom c se vezuje za citoplazmatski protein Apaf-1 gradeći apoptozom koji dalje vrši aktivaciju specifičnih kaspaza. Ovaj put aktivacije zove se mitohondrijalni put. Navedena dva puta aktivacije su do sada najbolje ispitani, ali pored njih postoje i brojni drugi putevi za pokretanje apoptoze.

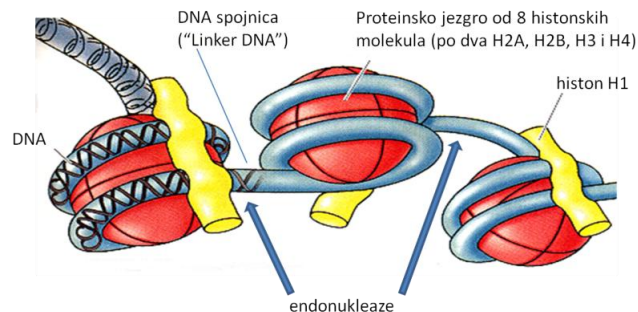


Slika 2.39. Dva glavna puta apoptoze: intracelularna i ekstracelularna inicijacija

Nakon inicijacije apoptoze na neki od navedenih načina, na scenu stupaju enzimi kaspaze, koji igraju važnu ulogu u daljoj regulaciji procesa. Familiju kaspaza čine 14 enzima – cistein proteaza, koje se prema svojoj funkciji u procesu apoptoze dele na inicijalne i izvršne kaspaze. Sve se nalaze u obliku inaktivnih zimogena i aktiviraju se tek kada započne apoptoza. Inicijalne kaspaze (kaspaze 8, 9, 10) se nalaze u obliku monomera i aktiviraju se dimerizacijom, a zatim vrše aktivaciju izvršnih kaspaza (kaspaze 3, 6, 7) razlaganjem dimera na monomere. Procenjeno je da jednom aktivirane izvršne kaspaze raskidaju veze u oko 400 različitih proteina. Tako na primer, aktivna kaspaza-3 katalizuje u nukleusu odvajanje kaspaza-zavisne endonukleaze (CAD) od njenog inhibitora (ICAD) i na taj način aktivira CAD, izuzetno važan enzim u završnoj fazi apoptoze (Sakahira i drugi, 1998).

Pored CAD postoje i druge endogene endonukleaze, kao što su endonukleaza G i apoptoza indukcionni faktor (AIF), za čiju aktivaciju nisu potrebne kaspaze. Endogene endonukleaze u završnoj fazi apoptoze („execution phase“) vrše fragmentaciju DNA u nukleusu. DNA je u hromatinu sisarskih ćelija spakovana u nukleozome. Nukleozomi se sastoje od proteinskog jezgra izgrađenog od 8 histonskih molekula (po dva molekula H2A, H2B, H3 i H4) oko koga je obmotan dvostruki lanac DNA. Zbog čvrstih veza sa histonskim jezgrom, DNA u nukleozomima zaštićena je od delovanja endogenih endonukleaza (Burgoyne et al., 1974; Hengartner, 2001). Shodno tome,

endonukleaze u toku apoptoze seku dvostruki lanac DNA samo na mestima između dva nukleozoma (DNA spojnice ili „linker DNA“) i na taj način vrše internukleozomalnu fragmentaciju, pri čemu nastaju mono- i oligonukleozomi (Slika 2.40.).



Slika 2.40. Internukleozomalna fragmentacija dvostrukog lanca DNA u hromatinu delovanjem endogenih endonukleaza (AIF, CAD, endonukleaza G)

AIF i endonukleaza G funkcionišu nezavisno od kaspaza, AIF secka DNA na fragmente veličine 50-300 kb (Joza i drugi, 2001), dok endonukleaza G cepa hromatin na oligonukleozomalne DNA fragmente (Li i drugi, 2001). CAD katalizuje internukleozomalnu DNA fragmentaciju u intervalima ~180 bp, zbog čega dolazi do izražene kondenzacije hromatina (Enari i drugi, 1998).

Pored aktivacije endonukleaza, izvršne kaspaze aktiviraju i specifične proteaze koje razgrađuju jedarne i citoskeletne proteine, što sve dovodi do morfoloških i biohemijskih promena u apoptotskoj ćeliji (Slee i drugi, 2001). Takođe, neke kaspaze mogu imati ulogu u regulaciji ne-apoptotskih procesa, kao što su proces inflamacije ili događaji vezani za ćelijsku deobu i proliferaciju (Schwerk i Schulze-Osthoff, 2003; Kuranaga i Miura, 2007).

Na samom kraju apoptoze ćelija se raspada na apoptotska tela, dolazi do translokacije fosfatidilserina na spoljašnju stranu njihove membrane, što je signal fagocitima da izvrše fagocitozu, koja nije praćena inflamacijom (Bratton i drugi, 1997; Fadok i drugi, 2001) (Slika xx). S obzirom da apoptotska tela bivaju razgrađena fagocitozom veoma brzo, proces apoptoze se teško može uočiti pod mikroskopom, zbog čega je dugo vremena bio neotkriven.

U mnogim situacijama tipovi ćelijskih smrti nisu striktno razdvojeni već mogu međusobno da se ukrštaju i da se isti receptori i signalni putevi javljaju i kod apoptoze i kod nekroze. Tako u slučaju da dođe do smanjenja raspoloživosti kaspaza ili količine intracelularnog ATP-a, proces apoptoze može da se konvertuje u proces nekroze (Leist i drugi, 1997; Denecker i drugi, 2001). Takođe, različiti štetni stimuli kao što su radijacija, hipoksija i citotoksični antikancer lekovi, indukuju apoptozu ako se primene u malim dozama, dok pri većim dozama intenzitet apoptoze može da prevaziđe kapacitet fagocita, što rezultuje nekrozom (Elmore, 2007).

2.4.4.2 Inhibicija apoptoze u tumorskim ćelijama

Tumorske ćelije su razvile različite mehanizme za inhibiciju apoptoze, dok je njihova proliferacija prekomerna. Najčešći mehanizam je ekspresija anti-apoptotičkih proteina kao što su proteini Bcl-2 familije (Vaux i drugi, 1988), zatim inhibicija pro-apoptotičkih proteina, kao što je Bax. Ekspresija Bcl-2 i Bax regulisana je p53 tumor-supresor proteinom (Miyashita, 1994). p53 je transkripcioni faktor koji reguliše ćelijski ciklus i gen za njegovu ekspresiju je najrasprostranjeniji mutirani gen u humanoju tumorogenezi (mutacija na p53 genu javlja se u preko 50% od svih

humanih kancera) (Wang i Harris, 1997). Uloga p53 proteina je da aktivira proteine koji vrše reparaciju oštećene DNA, zadržava ćelijski ciklus u G1/S regulacionoj tački kada je uočena greška na DNA, i inicira apoptozu u slučaju da je greška na DNA nepopravljiva (Pientenpol i Stewart, 2002). Ako dođe do oštećenja p53 pod uticajem radijacije, različitih hemikalija ili virusa kakav je na primer humani papiloma virus (HPV), supresija tumora je smanjena i dolazi do tumorogeneze (Elmore, 2007).

Kod mnogih tumora do supresije apoptoze dolazi i usled povećane ekspresije proteina iz IAP familije (IAP – proteini inhibitori apoptoze). Ovi proteini se uglavnom ponašaju kao inhibitori kaspaza i na taj način inhibiraju apoptozu (Deveraux i Reed, 1999; Yang i drugi, 2003).

Još jedan način supresije apoptoze u tumorskim ćelijama je ometanje ekstracelularnih regulatornih mehanizama apoptoze tj. inhibicija normalnog delovanja imunog sistema (Smyth i drugi, 2001). Naime, određene ćelije imunog sistema (T ćelije i ćelije ubice) uništavaju tumorske ćelije preko perforin/granzim B puta ili puta receptora smrti. Receptor smrti FasR je lociran na membranama ciljnih ćelija i za njega se vezuje Fas ligand (FasL - tip II transmembranski protein iz TNF familije, koga proizvode T ćelije), što indukuje apoptozu. Kako bi izbegle sopstveno uništenje od strane imunog sistema, neke tumorske ćelije smanjuju količinu Fas receptora na plazma membrani, ekspresuju nefunkcionalne Fas receptore, sekretuju velike količine rastvornog Fas receptora koji zarobljava Fas ligande, ili same sekretuju Fas ligand i na taj način vrše kontranapad (Cheng i drugi, 1994; Cefai i drugi, 2001; Elnemr i drugi, 2001; Koyama i drugi, 2001).

Prihvaćeni načini lečenja kancera uključuju operaciju, zračenje i hemoterapiju. Lekovi koji se koriste u hemoterapiji uglavnom omogućavaju privremeni nestanak simptoma, produžetak života i u nekim slučajevima dovode do izlečenja. Uspešnim antikancer lekom smatra se onaj koji ubija ili onespobavlja tumorske ćelije bez većeg štetnog delovanja na normalne ćelije. Međutim, do sada otkriveni antitumorski lekovi imaju slabu selektivnost, pa deluju i na zdrave ćelije, što dovodi do brojnih neželjenih posledica. Više od 50% ovih lekova su prirodni proizvodi ili njihovi semisintetski derivati (Kingston, 2011). Pored onih koji su prihvaćeni u oficinalnoj medicini, postoji još veliki broj prirodnih proizvoda za koje je dokazano antitumorsko delovanje, ali su kliničke studije još uvek u toku. Ovi proizvodi pretežno potiču iz viših biljaka (preko 25%), dok su drugi izolovani iz mikroorganizama, gljiva i marinskih organizama (Cragg i Newman, 2013). Neki od najpoznatijih lekova biljnog porekla koji se primenjuju u kliničkoj praksi su paklitaksel (Taxol®), koji je izolovan iz *Taxus* vrsta, i njegovi semisintetski analozi docetaksel i kabazitaksel, zatim semisintetski derivati lignana epipodofilotoksina – etopozid i tenipozid, alkaloidi vinblastin i vinkristin i semisintetski derivati hinolinskog alkaloida kamptotehina – topotekan, irinotekan i belotekan. Većina ovih lekova deluje tako što na različite načine indukuje apoptozu (Taraphdar i drugi, 2001). Brojna istraživanja pokazala su da i mnogi drugi prirodni proizvodi, naročito pojedine fenolne kiseline, flavonoidi i sumporna jedinjenja, pokreću apoptozu u neoplastičnim ćelijama i to tako što ili stimulišu indukzione faktore apoptoze ili sprečavaju delovanje njenih inhibitora, pri čemu je efekat na zdrave ćelije mnogo manje izražen (Chiao i drugi, 1995; Rao i drugi, 1995; Samaha i drugi 1997; Anantharaman i drugi, 2014).

Pored primene prirodnih proizvoda u terapiji kancera, veoma je važna i njihova uloga u prevenciji ovih oboljenja. Brojne epidemiološke studije ukazale su da ishrana bogata hranom biljnog porekla (voće i povrće), može da smanji rizik od razvoja kancera, što je doprinelo njenom značaju kao funkcionalne hrane (Block i drugi, 1992; Reddy i drugi, 1997; Imai i drugi, 1997; Knekt i drugi, 2002; Pedersen i drugi, 2003; Beecher, 2003; Aggarwal i Shishodia, 2006; Benetou i drugi, 2008).

Danas se smatra da indukovanje apoptoze u tumorskim ćelijama može značajno da doprinese kontroli, terapiji i prevenciji kancera. Testovi na ćelijama kojima se ispituju fenomeni vezani za

ćelijsku smrt široko se primenjuju u razvoju lekova. Pored samog kvantifikovanja ćelijske smrti, važno je da ovi testovi omoguće i određivanje mehanizma putem kojeg potencijalni lekovi moduliraju ćelijsku smrt. To znači da ovi testovi treba da identifikuju kako podprogram ćelijske smrti, tako i da omoguće dekonvoluciju biohemijjskih kaskada i identifikaciju signalnih molekula koji su inhibirani ili pobuđeni delovanjem potencijalnog leka.

2.4.4.3 Metode za ispitivanje ćelijske smrti

U poslednjih nekoliko decenija razvijene su brojne metode za ispitivanje ćelijske smrti i praćenje uticaja različitih agenasa na nju. Tu spadaju metode za određivanje vijabilnosti ćelija, zatim metode određivanja tipa ćelijske smrti i na kraju metode ispitivanja mehanizma ćelijske smrti. Naročito široku primenu ove metode su našle u razvoju lekova, gde je potrebno odrediti ne samo stepen inhibicije ili aktivacije ćelijske smrti potencijalnim lekom, nego i mehanizam kojim on vrši modulaciju ovog procesa.

Metode za određivanje vijabilnosti ćelija

Metode za određivanje vijabilnosti ćelija, tj. broja živih ćelija u uzorku, su najjednostavnije i obično se koriste za određivanje citotoksičnosti tj. sposobnosti nekog hemijskog agensa (leka, toksina patogena ili jedinjenja iz hrane ili kozmetičkog proizvoda) da izazove ćelijsku smrt. Takođe se koriste za određivanje stepena ćelijske proliferacije pod različitim eksperimentalnim uslovima. Prva grupa ovih metoda zasniva se na povećanoj propustljivosti membrane mrtvih ćelija u odnosu na žive ćelije, zbog čega određeni reagensi (tripan plavo, propidijum jodid, 7-aminoaktinomycin D) selektivno ulaze samo u mrtve ćelije, gde reaguju sa ćelijskim proteinima ili DNA, što dovodi do promene boje. Obojene ćelije se prebrojavaju pomoću citometra, svetlosnog ili fluorescentnog mikroskopa i izračunava se procenat živih ćelija kao odnos broja živih ćelija i ukupnog broja ćelija. Druga grupa metoda za određivanje vijabilnosti zasniva se na bojenju živih ćelija, pri čemu se intenzitet boje meri spektrofotometrijski ili fluorimetrijski. Reagensi za bojenje koji se najčešće koriste su: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromide (MTT), resazurin, sulforodamin B (SRB), N-heksametilpararozanilin (kristal-violet – CV (“cristal violet”)). U MTT testu mitohondrijalna dehidrogenaza živih ćelija redukuje žuto obojeni MTT u plavo-ljubičasti formazanski proizvod, čija se absorbancija meri na 570 nm (Mosmann, 1983). U resazurinskom testu, plavo obojeni nefluorescentni oksidovani resazurin ulazi u ćeliju gde biva redukovano u crveno obojeni fluorescentni rezorufin, što se može pratiti kolorimetrijski ili fluorometrijski (O’Brien i drugi, 2000). Resazurin nije toksičan za ćelije i stabilan je u medijumu za gajenje, pa je posebnu primenu našao kod kontinualnog praćenja ćelijske proliferacije i merenja kinetike (Zhang i drugi, 2004). U SRB testu se fluorescentna anjonska boja sulforodamin B elektrostatički vezuje za pozitivno naelektrisane aminokiselinske ostatke ćelijskih proteina dajući izrazito stabilne konjugate koji fluoresciraju jarko crveno (Skehan i drugi, 1990). Intenzitet boje koji se određuje spektrofotometrijski na 540 nm direktno je proporcionalan broju živih ćelija. U CV (“cristal violet”) testu N-heksametilpararozanilin ulazi u živu ćeliju, vezuje se za DNA i boji ćeliju u ljubičasto (Flick i Gifford, 1984). Intenzitet boje meri se na 540 nm i direktno je proporcionalan broju živih ćelija (Gillies i drugi, 1986; Fujii i drugi, 1987). Za praćenje ćelijske proliferacije može se koristiti i BrdU test, u kome se 5-bromo-2'-deoksiuridin dodaje u medijum (Raza i drugi, 1985). Ovaj sintetski analog timidina se prilikom replikacije, koja prethodi ćelijskoj deobi, ugrađuje u novosintetisane DNA molekule proliferirajućih ćelija umesto timidina. Ćelije sa BrdU ugrađenim u DNA se zatim vizuelizuju i kvantifikuju spektrofotometrijski ili hemiluminiscentnom metodom (Schulze-Osthoff, 2008). Pored metoda koje se zasnivaju na bojenju živih ili mrtvih ćelija, za procenu vijabilnosti koristi se i metoda određivanja intracelularne koncentracije ATP-a, zbog

činjenice da jedino žive ćelije proizvode ATP. Međutim, smanjena koncentracija ATP-a ne mora uvek da znači da su ćelije mrtve (Galluzzi i drugi, 2009).

U ovom radu, za praćenje uticaja ekstrakata vrsta roda *Allium* na ćelijski rast zdravih i tumorskih ćelija odabrana je metoda bojenja živih ćelija fluorescentnom anjonskom bojom sulforodamin B, jer je jednostavna, osetljiva, primenljiva na sve vrste ćelija i pokazuje bolju linearnost odnosa absorbance i broja ćelija u poređenju sa MTT testom, pa se može koristiti za ispitivanje šireg opsega koncentracija citotoksičnog agensa (Keepers i drugi, 1991).

Metode za određivanje tipa ćelijske smrti

Najpouzdanije metode za određivanje tipa ćelijske smrti zasnivaju se na razlikama u morfološkim karakteristikama između apoptoze, nekroze i autofagije, i tu spadaju fluorescentna mikroskopija, elektronska mikroskopija i protočna citometrija (Kepp i drugi, 2011). Međutim, ove metode zahtevaju skupu opremu, dobro obučeno osoblje i nisu naročito pogodne za određivanje stepena apoptoze, za čije izračunavanje je potrebno posmatranje velikog broja ćelija. Zbog toga je razvijen čitav niz metoda u kojima se paćenjem biohemijskih parametara mogu identifikovati i kvantifikovati ćelije sa određenim tipom ćelijske smrti. S obzirom da je proces apoptoze veoma kompleksan i strogo kaskadno regulisan, broj parametara koji može biti praćen je veliki. Tako se mogu pratiti: aktivnost specifičnih kaspaza, DNA fragmentacija, mitohondrijalni poremećaji, izlazak fosfatitilserina na spoljašnju stranu membrane (Schulze-Osthoff, 2008).

Aktivacija kaspaza je bila univerzalni marker apoptoze pre nego što su otkriveni apoptotski putevi koji su nezavisni od kaspaza. Pored toga, otkriveno je da pojedine kaspaze imaju ulogu i u neapoptotskim procesima, što je smanjilo njihov značaj kao markera. Međutim, u kombinaciji sa drugim metodama, metode za kvantifikaciju kaspazne aktivnosti se i dalje koriste za detekciju apoptoze. One se uglavnom zasnivaju na imunološkim principima, pri čemu se koriste antitela specifična za aktivirane kaspaze ili proizvode nastale katalitičkom aktivnošću ovih enzima. Takođe, mogu biti zasnovane i na dodatku egzogenih proluminescentnih ili fluorogenih supstrata ovih enzima, pri čemu se meri količina nastalih luminescentnih ili fluorescentnih proizvoda (Galluzzi i drugi, 2009).

Među najčešće primnjivanim metoda u određivanju tipa ćelijske smrti su one koje se zasnivaju na detekciji DNA fragmenata. Internukleozomalna fragmentacija DNA delovanjem endogenih endonukleaza je obavezna karakteristika apoptoze, dok kod nekrotičnih ćelija dolazi do kasnije i nasumične DNA fragmentacije usled oslobađanja lizozomalnih DNA-aza. Tehnike za detekciju DNA fragmenata zato nisu strogo specifične za apoptozu, ali se prethodnim razdvajanjem apoptotičnih od nekrotičnih ćelija centrifugiranjem mogu dobiti rezultati za svaki tip ćelija posebno (Schulze-Osthoff, 2008). Tradicionalna tehnika za dokazivanje internukleozomalne DNA degradacije je gel elektroforeza (Wyllie, 1980). Primenom ove tehnike DNA fragmenti se razdvajaju, pri čemu se apoptotične ćelije prepoznaju po karakterističnom rasporedu DNA fragmenata na gelu (oblik merdevina, eng. „DNA ladder“), dok se kod nekrotičnih ćelija na gelu javlja samo razvučena mrlja nasumično fragmentisane DNA. Takođe, veoma elegantna metoda za kvantifikaciju apoptotskih ćelija je osetljiva enzimaska sendvič-imunoadsorbicna tehnika (ELISA) koja koristi anti-histon i anti-DNA antitela za detekciju mono- i oligonukleozoma nastalih internukleozomalnom fragmentacijom DNA (Schulze-Osthoff, 2008). Pored nje, u širokoj upotrebi je i TUNEL metoda, kod koje se za obeležavanje krajeva DNA fragmenata koristi enzim terminalna transferaza (Gavrieli i drugi, 1992). Ovaj enzim katalizuje vezivanje dUTP derivata na krajeve DNA fragmenata, što se može kvantifikovati protočnom citometrijom ili fluorescentnom mikroskopijom na osnovu imunoperoxidazne reakcije.

Detekcija fosfatidilserina na površini apoptotskih ćelija fluorescentnim ili imuno- metodama se takođe koristi kao marker apoptoze, ali i ona ima nedostatke (Kepp i drugi, 2011). Naime, do izlaska fosfatidilserina na površinu ćelije kao signala za fagocitozu ne dolazi kod svih apoptotskih ćelija, a s druge strane se ovaj proces može javiti i kod stanja koja nisu vezana za ćelijsku smrt (Fischer i drugi, 2006).

Za utvrđivanje tačnog mehanizma ćelijske smrti mogu se pratiti biohemijski parametri specifični za pojedine signalne puteve. Tako se npr. može određivati propustljivost membrane mitohondrija (MMP), pojave koja je prvenstveno karakteristična za intracelularni put inicijacije apoptoze, mada delimično može da bude uključena i u ekstracelularni put. Pro-apoptotski proteini indukuju MMP, a posledica ovoga je rasipanje trans-membranskog potencijala mitohondrije, prestanak sinteze ATP-a, prekomerna produkcija ROS i oslobađanje citotoksičnih proteina iz intermembranskog prostora mitohondrije u citozol (Kroemer i drugi, 2007). Razvijene su brojne metode za praćenje svakog od ovih pojedinačnih događaja. Naročito su značajne metode na izolovanim mitohondrijama jer se, u odnosu na cele ćelije, znatno lakše mogu kontrolisati eksperimentalni uslovi i pratiti samo željeni parametri (Zoratti i drugi, 2005). Ovim metodama se za relativno kratko vreme može ispitati uticaj velikog broja različitih jedinjenja na bubrenje mitohondrija i MMP, kao i potencijalni inhibitorski uticaj na aktivnost apoptozoma ili aktivnost pro-apoptotskih proteina (Stavrovskaya i drugi, 2004).

Za detekciju nekroze najčešće se koriste jednostavne metode zasnovane na biohemijskoj kvantitaciji intracelularnih proteina (uglavnom enzima) oslobođenih iz ćelije usled oštećenja plazma membrane. Tu spadaju fluorometrijsko ili kolorimetrijsko određivanje glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (G6PD) i laktat dehidrogenaze (LDH) (Galluzzi i drugi, 2009), zatim kvantitacija HMGB1 proteina (*eng.* "high-mobility group protein B1") ELISA metodom ili fluorescentnom mikroskopijom (Scaffidi i drugi, 2002). Nedavno je otkriveno da se i ciklofilin A, citozolna peptidil-prolil cis-trans izomeraza, oslobađa iz ćelije u ranim fazama nekroze i da se njena kvantitacija ELISA kitovima može koristiti kao biohemijski marker nekrotičnih ćelija (Christofferson i Yuan, 2010).

Za identifikaciju autofagije koriste se elektronska mikroskopija za kvantitaciju autofagozoma i autofago lizozoma, imunobloting metode i imunofluorescentna mikroskopija za detekciju specifičnih lipida koji učestvuju u izgradnji membrane autofagozoma ili detekciju proizvoda degradacije autofagičnih supstrata (Kepp i drugi, 2011).

Međutim, sve navedene metode za određivanje tipa ćeliske smrti imaju svoje prednosti i nedostatke, prvenstveno zato što vrlo često dolazi do delimičnog preklapanja procesa apoptoze sa procesom nekroze, a i mnogi ćelijski medijatori nisu specifični samo za proces ćelijske smrti, već se javljaju i u drugim procesima. Takođe, putevi apoptoze nisu univerzalni za sve tipove ćelija. Zbog toga je važno napraviti dobar odabir metoda prilikom planiranja eksperimenta (Schulze-Osthoff, 2008).

U ovom radu, za relativnu kvantifikaciju apoptoze i nekroze i njihovu diferencijaciju korišćena je osetljiva enzimaska sendvič-imunohemijska tehnika (ELISA), koja se zasniva na kvantifikaciji DNA fragmenata kompleksiranih sa histonima (mono- i oligonukleozoma), nastalih internukleozomalnom fragmentacijom DNA (Cell Death Detection ELISA^{Plus} kit). Nakon centrifugiranja ćelijske kulture, mono- i oligonukleozomi koji potiču iz nekrotičnih ćelija nalaze se u supernatantu i iz njega se određuju, dok se apoptotska tela koja se nalaze u talogu prvo liziraju, a zatim se u lizatu određuju mono- i oligonukleozomi. S obzirom da antitela koja se koriste u ovom testu nisu specifična za određenu vrstu ćelija, kit je primenljiv na veliki broj različitih vrsta ćelija. Prednosti ove metode su da se iz istog uzorka mogu zasebno odrediti i nekrotične i apoptotične

ćelije, brza je i jednostavna, postiže se veoma velika osetljivost i pogodna je za rad sa velikim brojem uzoraka (eng. „high-throughput screening“).

2.5 FARMAKOLOŠKE AKTIVNOSTI I MEDICINSKI ZNAČAJ VRSTA RODA *ALLIUM*

Crni (*Allium cepa* L.) i beli luk (*A. sativum* L.) se zbog specifičnog oštrog ukusa i mirisa vekovima gaje i koriste kao povrće i začini u ljudskoj ishrani širom sveta. Pored ove dve najpoznatije vrste, u veoma širokoj upotrebi su i gajene vrste – praziluk (*A. porrum* L.), aljma ili zimski luk (*A. fistulosum* L.), kozjak (*A. cepa* var. *aggregatum*, *A. ascalonicum* Hort.), sremuš (*A. ursinum* L.), luk biserac (*A. ampeloprasum* L.), vlašac (*A. schoenoprasum* L.) i kineski vlašac (*A. tuberosum* L.) (Lanzotti, 2006). Sličan ukus i miris imaju i divlje vrste roda *Allium* i sve spadaju u jestive biljke. Listovi i cvetovi se najčešće koriste sveži u salatama. Listovi se mogu jesti i kuvani u supama i varivima. Lukovice divljih lukova se takođe mogu koristiti u ishrani, iako su znatno sitnije od lukovica gajenih lukova. Lukovi se veoma lako gaje i dobro uspevaju u baštama (Plants for a future, 2013).

Pored primene u kulinarske svrhe, beli i crni luk se zbog svojih lekovitih svojstava koriste od davnina i u medicinske svrhe. Crni luk se u tradicionalnoj medicini mnogih zemalja preporučuje protiv bola i otoka posle uboda osa ili pčela, za lečenje bakterijskih infekcija (dizenterije), čireva, rana, ožiljaka, astme, bronhitisa, kolere, bola u uhu, groznice, visokog krvnog pritiska, žutice i drugih infektivnih i inflamatornih bolesti. Zabeležena je i njegova upotreba kao diuretika, antihelmintika, afrodisijaka, emenagoga, sredstva za iskašljavanje i kao pomoćnog sredstva u terapiji dijabetesa (WHO, 1999). Beli luk se u narodnoj medicini koristi u tretmanu infekcija respiratornih puteva i urinarnog trakta, u lečenju dispepsije, reumatskih stanja, astme i bronhitisa, zatim kao antipiretik, diuretik, emenagog, ekspektorans, sedativ, afrodisijak, sredstvo protiv nadimanja (WHO, 1999).

Kako bi se opravdala ovako široka primena belog i crnog luka, u poslednjih pedeset godina sproveden je izrazito veliki broj naučnih istraživanja, koja su potvrdila da ovi lukovi ispoljavaju čitav spektar farmakoloških aktivnosti. Tako je dokazano da beli luk poseduje antimikrobnu (Benkeblia, 2004), antidijabetsku (Ashraf i drugi, 2011) i antiproliferativnu aktivnost (Yang i drugi, 2001; Thomson i Ali, 2003), redukuje rizik od kardiovaskularnih bolesti (Thomson i drugi, 2006) i stimuliše imuni odgovor organizma (Lau i drugi, 1991). Istraživanja bioloških aktivnosti crnog luka rađena su u mnogo manjem obimu nego u slučaju belog luka, ali je i za ovu vrstu dokazano da pokazuje visoku antioksidantnu, antidijabetsku, antiinflamatornu, antimikrobnu, antikancerogenu, antihiperlipidemičnu, hipotenzivnu, hipoglikemičnu, bronhodilatatornu, diuretsku, i antitrombotsku aktivnost (Gorinstein i drugi, 2008; Bora i Sharma, 2009; Lee i drugi, 2008).

Za neke od ovih aktivnosti potvrđena je i terapijska efikasnost u zvaničnoj medicini, što je omogućilo da primena crnog i belog luka bude odobrena od strane različitih komisija za registraciju biljnih preparata (Blumenthal i sar., 1999; WHO, 1999; Ph. Eur. 3, 1997; Ph. Eur. 6, 2007; British herbal pharmacopeia, 1990; African pharmacopoeia, 1985).

2.5.1 Antimikrobna aktivnost

Naučni interes za lekovitost belog luka počeo je u drugoj polovini XIX veka, kada je utvrđeno da ova biljka sprečava rast i razmnožavanje određenih sojeva bakterija. 1930. godine

nemački naučnik Leman F. A. je eksperimentalno utvrdio da beli luk sprečava rast *Bacillus proteus*. Za vreme II svetskog rata beli luk se zbog antiseptičnog delovanja koristio u prevenciji gangrene (Božin, 2009). Kasnije je eksperimentalno potvrđeno da beli luk ispoljava antibiotski efekat na širok spektar gram-(+) i gram(-) bakterija kao što su *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Mycobacterium* sp., *Micrococcus* sp. i *Pseudomonas* sp. (Elnima i drugi, 1983; Ankri i Mirelman, 1999; Amagase i drugi, 2001; Benkeblia, 2004; Ross i drugi, 2001; Bakri i Douglas, 2005; Ruddock i drugi, 2005, Delaha i Garagusi, 1985; Harris i drugi, 2001). Efikasnost alicina i ekstrakta belog luka na *Shigella flexneri*, uzročnika šigeloze, potvrđena je i predkliničkim ispitivanjima (Chowdhury i drugi, 1991). Cavallito i Bailey su 1944. godine prvi ustanovili da se antibakterijska aktivnost belog luka može pripisati alicinu, a kasnije je potvrđeno da su i ostala isparljiva sumporna jedinjenja prisutna u etarskom ulju odgovorna za snažno antimikrobno delovanje (Matsuura, 1997; Ankri i Mirelman, 1999). Smatra se da je sposobnost alicina da reaguje sa tiolnim grupama različitih enzima bakterija odgovorna za njegovu antimikrobnu aktivnost (Ankri and Mirelman 1999). Dalja ispitivanja ukazala su na to da su sumporna jedinjenja belog luka efikasna i protiv *Helicobacter pylori*, uzročnika čira na želucu (Cellini i drugi, 1996; Mahady, 2001). Za crni luk je takođe dokazana antimikrobna aktivnost, ali znatno manja u poređenju sa aktivnošću belog luka (Elnima i sar., 1983; Kim 1997; Benkeblia, 2004; Bakht i drugi, 2013; Hughes i Lawson, 1991; Santas i drugi, 2010), dok su dva derivata alkaloida kantina izolovana iz *A. napolitanum*, pokazala inhibitorni potencijal na rast *Mycobacterium* sp. i *Staphylococcus aureus* (Donnell i Gibbons, 2007). Etarsko ulje izolovano iz cvasti *A. sphaerocephalon* pokazalo je jaku antibakterijsku aktivnost naročiti prema vrsti *Pseudomonas aeruginosa* (Lazarević i drugi, 2011). Ekstrakti samoniklih predstavnika tipične sekcije *Allium* sa teritorije Srbije (*A. scorodoprasum*, *A. rotundum*, *A. sphaerocephalon*, *A. vineale*, *A. guttatum* i *A. atroviolaceum*) pokazali su snažno antibakterijsko delovanje na gram-pozitivne bakterije, dok na gram negativne bakterije nisu imali efekta (Božin, 2009). Takođe, nekoliko *in vivo* istraživanja na životinjama i ljudima pokazala su da oralno konzumiranje svežeg zdrobljenog belog luka ili etarskog ulja belog luka ima sistemski antimikrobni efekat na pluća, bubrege, mozak, krv i cerebrospinalnu tečnost (Lawson, 1998).

Pored antibakterijskog delovanja, utvrđeno je da beli luk ispoljava i snažnu antifungalnu aktivnost na različite plesni i gljivice kao što su *Candida* sp., *Cryptococcus* sp., *Trichophyton* sp., *Epidermophyton* sp. i *Microsporum* sp. (Davis drugi, 1994; Hughes i Lawson, 1991; Yamada i Azuma, 1997; Ankri i Mirelman, 1999; Shams-Ghahfarokhi i drugi, 2006), kao i na gljivice koje proizvode mikotoksine (*Aspergillus parasiticus*, *A. niger*, *A. flavus* i *A. fumigates*) (Yin i Tsao, 1999; Benkeblia, 2004). Takođe, najnovija ispitivanja su pokazala da etarsko ulje belog luka deluje antifungalno na uzročnike kožnih mikoza kod ljudi (*Trichophyton rubrum*, *T. erinacei* i *T. soudanense*) (Pyun i Shin, 2006), dok su gljivični sojevi *Malassezia furfur* i *Candida* sp. bili osetljivi na delovanje vodenog ekstrakta crnog luka (Shams-Ghahfarokhi i drugi, 2006). Derivati cimetne kiseline izolovani iz Persijskog praziluka (*Allium ampeloprasum* subsp. *persicum*) pokazali su antifungalnu aktivnost na sojevima *Penicillium italicum*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* i *Trichoderma harzianum* (Sadeghi i drugi, 2013), dok su ekstrakti *A. rotundum* subsp. *waldsteinii* i *A. scorodoprasum* ispoljili značajno antifunglano delovanje na *Candida albicans* i *Candida tropicalis* (Božin, 2009). Antifungalnu aktivnost pokazali su i *A. porrum* (Fattorusso i drugi, 1999), *A. obliquum* (Pârvu i drugi, 2009), *A. ursinum* (Pârvu i drugi, 2011), *Allium sphaerocephalon* (Lazarević i drugi, 2011), *A. senescens*, *A. fistulosum*, *A. ascalonicum*, *A. neapolitanum* (Vlase i drugi, 2012). N-feruloiltirozin i N-feruloiltiramin, koji su izolovani iz korena belog luka, pokazali su jako antifungalno delovanje na *Fusarium culmorum* (Fattorusso i drugi, 1999).

Alicin i preparati na bazi svežeg belog luka ispoljavaju i značajnu *in vitro* i *in vivo* antiviralnu aktivnost. Ovo je naročito značajno jer infektivne bolesti uzrokovane virusima predstavljaju veliki problem, s obzirom da za mnoge bolesti ne postoje odgovarajući antiviralni lekovi, a za one za koje postoje, terapija obično traje mnogo duže nego kada su etiološki faktor infekcije drugi mikroorganizmi. Broj agenasa koji deluje na viruse je relativno mali, zbog čega je neophodno iznalaženje novih antiviralnih supstanci koje bi se koristile ne samo u terapijske svrhe, već i u cilju prevencije virusnih oboljenja. Bez obzira da li agens deluje na neku od faza replikacije virusa, ili inaktivira ekstracelularne forme virusa, tj. virione, on se naziva antiviralni agens. U kontekstu sa ovim drugim načinom delovanja često se koristi i pojam virucidna aktivnost. Prirodni proizvodi predstavljaju važan izvor ovih jedinjenja, zbog čega se poslednjih godina intenzivno proučavaju (Reichling i drugi, 2009; Gravin i drugi, 2010). Virusi osetljivi na delovanje sumpornih jedinjenja belog luka su koksaki virus, humani citomegalovirus (HCMV), virus influence tip B, *Herpes simplex* tip 1 i 2, virus para-influence tip 3, humani rinovirus tip 2, *Vaccinia virus* i vezikularni stomatitis virus, humani imunodeficientni virus (HIV) (Tsai i drugi, 1985; Park i drugi, 2005; Tatarintsev i drugi, 1992; Weber i drugi, 1992; Harris i drugi, 2001).

Istraživanja antihelminskog delovanja belog luka pokazala su da je veći broj crevnih parazita (*Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Trypanosoma*) osetljiv na alicin i ostala sumporna jedinjenja belog luka (Ankri i drugi, 1997; Lun i drugi, 1994).

U literaturi ima svega nekoliko podataka vezanih za antimikrobnu aktivnost vrsta iz sekcije *Codonoprasum*. Naime, samo za vrstu *A. flavum* dokazano je antibakterijsko delovanje na G⁺ bakterije *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis* (Curcic i drugi, 2012), kao i anti-*Aspergillus* delovanje na *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* i *A. restrictus* (Radojević i drugi, 2011).

2.5.2 Antioksidantna aktivnost

Brojna *in vitro* i *in vivo* ispitivanja različitih ekstrakata i preparata belog i crnog luka potvrdila su njihov izuzetan antioksidantni potencijal, koji se ogleda u sposobnosti hvatanja ROS, sposobnosti heliranja jona prelaznih metala, povećanju aktivnosti antioksidantnih enzima (superoksid-dizmutaze, katalaze i glutacion-peroksidaze, glutacion-S-transferaze i glutacion-reduktaze), povećanju količine redukovano glutaciona, inhibiciji lipidne peroksidacije i inhibiciji oksidacije LDL-holesterola (Lawson, 1998; Lanzotti, 2006; Gedik i drugi, 2005; Nishimura i drugi, 2004; Yang i drugi, 2004). Crni luk ima veću sposobnost hvatanja slobodnih radikala od belog luka, a crveni varijetet crnog luka je aktivniji od žutog (Nuutila i drugi, 2003; Gorinstein, 2008). U slučaju belog luka antioksidantna aktivnost se uglavnom pripisuje sumpornim jedinjenjima nastalim delovanjem aliinaze (alicin, dialil-disulfid, dialil-trisulfid) i sumpornim jedinjenjima prisutnim u „zrelom“ ekstraktu belog luka – S-alilcisteinu (SAC) i S-alilmerkaptocisteinu (SAMC), dok su kod crnog luka za antioksidantnu aktivnost najzaslužnija fenolna jedinjenja (Kim i drugi, 1997; Ide i drugi, 1996; Nishimura i drugi, 2004; Yin i drugi, 2002; Gorinstein, 2008; Kaur i drugi, 2009). Utvrđeno je da od sumpornih jedinjenja prisutnih u lukovima snažno inhibitorno delovanje na oksidaciju LDL-holesterola ispoljavaju derivati cisteina (S-metil-, S-propil- i S-alil-L-cistein, S-metil- i S-propil-L-cisteinesulfoksid), trisulfidi (dimetil-, dialil-, dietil-, di-n-propil-, diizopropil-, di-n-butil-trisulfid) i 2-vinil-4H-1,3-dithiin, i 3,4-dihidro-3-vinil-1,2-dithiin, dok S-alil-L-cistein sulfoksid i disulfidi (dialil-, di-n-butil-, diizopropil-, di-n-propil-, dietil- i dimetil-disulfid) ne pokazuju značajniju aktivnost (Nishimura i drugi, 2004). Kim i saradnici (2005) su ispitivali antioksidantnu aktivnost flavonoidnih glikozida (izokvercitrina, rejnourtrina, astragalina i izoramnetin 3-O-β-D-glukopiranozida) izolovanih iz listova i izdanaka belog luka i njihovih aglikona (kvercetrina, kemferola i izoramnetina) pomoću nekoliko testova: DPPH test, sposobnost

hvatanja OH radikala, i inhibicija peroksidacije linolenske kiseline. Utvrdili su da kvercetin i njegovi glikozidi ispoljavaju jaču antioksidantnu aktivnost od kemferola i izoramnetina i njihovih glikozida. Kvercetin iz crnog luka takođe ima sposobnost da štiti LDL holesterol od oksidacije, i na taj način smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti (Lanzotti, 2006). U istraživanjima na miševima dokazano je da dialil-trisulfid, koji se metaboliše slično kao allicin, mnogo efikasnije utiče na povećanje količine endogenog glutationa i aktivnost glutation-S-transferaze od dialil-sulfida (Lawson, 1998). Bozin i saradnici (2008) su utvrdili da ekstrakti celih biljaka mladog belog luka sadrže veći sadržaj fenolnih jedinjenja i pokazuju znatno veću sposobnost hvatanja DPPH radikala nego polarni ekstrakti zrele lukovice. Takenaka i saradnici su (2004) ispitivali uticaj zagrevanja na stabilnost fenolnih jedinjenja (uglavnom glikozida kvercetina), koji su nosioci antioksidantne aktivnosti crnog luka, i zaključili da su ova jedinjenja veoma stabilna i otporna na visoku temperaturu i da ne gube antioksidantnu sposobnost prilikom kuvanja hrane.

Pored crnog i belog luka značajnu antioksidantnu aktivnost *in vitro* pokazali su i ekstrakti i etarska ulja samoniklih lukova. Tako je dokazano da etil-acetatni ekstrakti *Allium* vrsta predstavnika podroda *Melanocrommyum* ispoljavaju izrazito visoku sposobnost hvatanja DPPH radikala (višu od sintetskog antioksidansa BHT) (Jedelská, 2007). Metanolni ekstrakti samoniklih vrsta *A. nevsehirense*, *A. sivasicum*, *A. dictyoprosom*, *A. scorodoprosom* subsp. *rotundum* i *A. atroviolaceum* pokazali su značajan DPPH skevindžer potencijal i sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije (Tepe i drugi, 2005). Pored toga, pripadnici sekcije *Allium* (*A. scorodoprasum*, *A. rotundum*, *A. sphaerocephalon*, *A. vineale*, *A. guttatum* i *A. atroviolaceum*) koji samoniklo rastu na teritoriji Srbije, ispoljili su visok stepen antioksidantne aktivnosti *in vitro* (Božin i drugi, 2009). Naj snažnije *in vitro* antioksidantno delovanje u svim ispitivanim test sistemima (NO[•], OH[•], DPPH[•], H₂O₂, lipidna peroksidacija indukovana Fe²⁺/askorbatom i sistemom Fe²⁺/H₂O₂) ispoljili su ekstrakti *A. scorodoprasum* dobijeni iz biljnog materijala poreklom sa Fruške gore i Deliblatske peščare, kao i *A. rotundum* subsp. *waldsteinii* u većini test-sistema. U *in vivo* eksperimentima na životinjama ekstrakti dobijeni iz belog luka, bez obzira na fenofazu biljke i način pripreme biljnog materijala, i ekstrakt *A. rotundum* subsp. *waldsteinii* ispoljili su značajno hepatoprotektivno delovanje nakon indukcije oksidativnog stresa ugljentetrahloridom. Jasno je uočljivo njihovo protektivno delovanje u procesima lipidne peroksidacije, uticaj na aktivnost enzima uključenih u ciklus glutationa (GSH-Px, GSH-R, GSH-(S)T) i količinu glutationa, kao i na katalazu i peroksidazu (Božin, 2009). Etarsko ulje cvasti *A. sphaerocephalon* subsp. *sphaerocephalon* takođe ispoljava antioksidantnu aktivnost zbog prisustva sumpornih jedinjenja i to prvestveno 3,5-dietil-1,2,4-tritriolana i n-propil 1-propenil tetrasulfida (Lazarević i drugi, 2011).

Stajner i saradnici (2006; 2008; 2009) su ispitivali antioksidantni status (aktivnost antioksidantnih enzima, količinu antioksidanasa i intenzitet lipidne peroksidacije) svežih gajenih (*Allium nutans* L., *A. fistulosum* L., *A. vineale* L., *A. pskemense* B. Fedtsch, *A. schoenoprasum* L., *A. cepa* L. i *A. sativum* L.) i samoniklih (*A. flavum* L., *A. sphaerocephalon* L., *A. atroviolaceum* Boiss, *A. vineale* L., *A. ursinum* L., *A. scorodoprasum* L., *A. roseum* L. i *A. subhirsutum* L.) lukova i utvrdili da gajeni lukovi imaju veću sposobnost odbrane od oksidativnog stresa od samoniklih lukova, što ukazuje na njihov potencijalno veći značaj kao antioksidanasa.

Od svih vrsta sekcije *Codonoprasum*, sa aspekta antioksidantne aktivnosti do sada su ispitivane samo vrste *A. flavum* i *A. oleraceum*. Curcic i saradnici (2012) pokazali su da acetonski, etil-acetatni i metanolni ekstrakti *A. flavum* imaju visok sadržaj fenolnih jedinjenja i visoku sposobnost hvatanja DPPH radikala. Etil-acetatni ekstrakt *A. oleraceum* je takođe pokazao visoku sposobnost hvatanja DPPH radikala (Jedelská, 2007).

2.5.3 Antiinflamatorna aktivnost

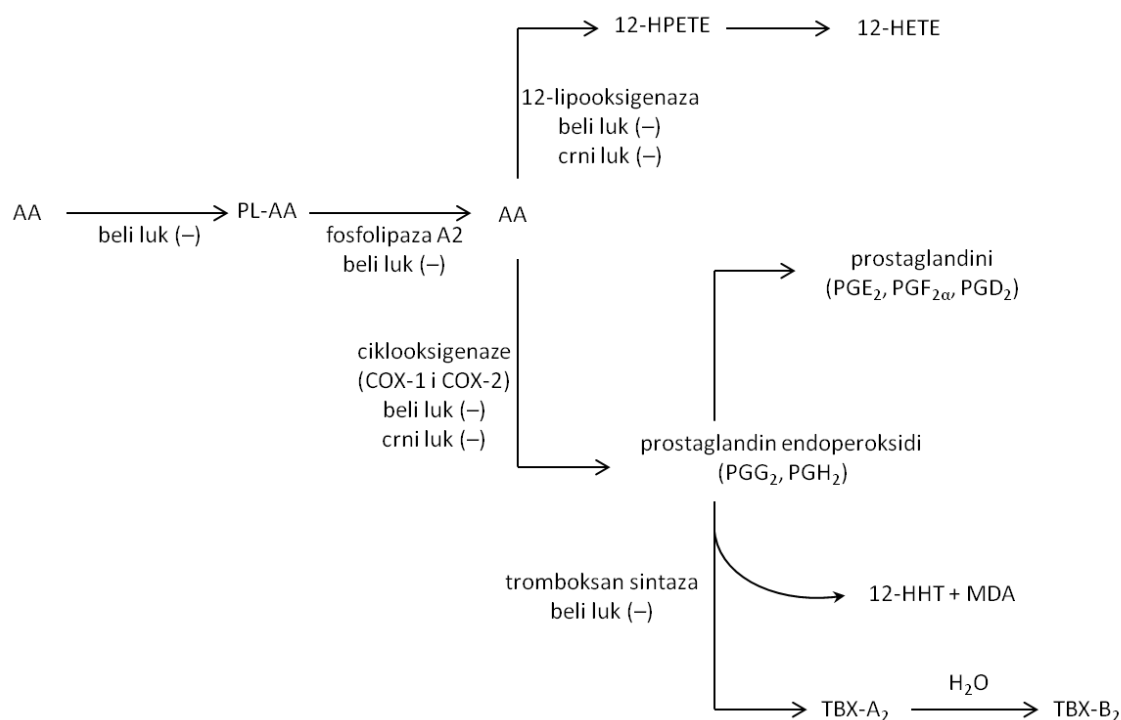
Istraživanja koja se odnose na antiinflamatornu aktivnost lukova nisu mnogobrojna, i uglavnom se tiču inflamatornih procesa u vaskularnom sistemu. Za crni i beli luk dokazano je da ispoljavaju antiinflamatornu aktivnost, i to na različitim nivoima. Jedan od načina kako beli luk ispoljava svoje antiinflamatorno delovanje je da inhibira oksidaciju LDL-a (Ide i Lau, 2001). Oksidovani LDL stimuliše adheziju i agregaciju trombocita i pokreće razvoj inflamacije, što dovodi do oštećenja vaskularnog sistema. Oksidaciju LDL pokreću lipoksigenaze, mijeloperoksidaza i NO sintaze. Supstance koje inhibiraju ekspresiju iNOS ili su dobri hvatači NO ili superoksid anjon radikala, ili inhibiraju lipoksigenazu i mijeloperoksidazu štite LDL od oksidacije. Vodeni ekstrakt belog luka, "zreli" ekstrakt belog luka (AGE) i njihova glavna komponenta S-alil cistein (SAC), deluju antiinflamatorno, jer inhibiraju iNOS u makrofagama i T ćelijama posredstvom inhibicije aktivacije NF- κ B, a samim tim inhibiraju i oksidaciju LDL (Geng i drugi, 1997; Ide i Lau, 2001; Kim i drugi, 2001). SAC ne utiče na ekspresiju i aktivnost eNOS, već ima sposobnost da povećava biološku raspoloživost i životni vek NO nastalog delovanjem eNOS u endotelnim ćelijama. Zahvaljujući svojoj antioksidantnoj sposobnosti, SAC uklanja superoksid anjon radikal čija je uloga da reaguje sa NO i inhibira njegovu biološku aktivnost. Zbog ovih efekata SAC deluje preventivno na nastanak ateroskleroze (Kim i drugi, 2001). Raso i saradnici (2001) su dokazali da kvercetin i apigenin inhibiraju produkciju NO i PGE₂ u makrofagama. Uzrok za smanjenu produkciju NO bila je inhibicija ekspresije iNOS, dok je do smanjenja koncentracija PGE₂ dovelo inhibitorno delovanje ovih flavonoida na ekspresiju COX-2. Apigenin je smanjio ekspresiju iNOS inhibicijom aktivacije NF- κ B, dok kvercetin nije uticao na aktivaciju NF- κ B, već je putem nekog drugog mehanizma inhibirao ekspresiju iNOS (najverovatnije modulacijom aktivnosti enzima koji učestvuju u vezivanju NF- κ B za DNA) (Wadsworth i Koop, 1999). Mnoga istraživanja ukazuju na mogućnost da NO zapravo reguliše aktivnost COX, pa je u tom slučaju opravdano očekivati da inhibitori iNOS istovremeno inhibiraju i ekspresiju COX (Salvemini i drugi, 1994). Ekstrakti lista i cveta *A. ursinum* pokazali su takođe antiinflamatornu aktivnost na modelu akutne inflamacije izazvane terpentinskim uljem na pacovima. Kod pacova tretiranih ekstraktima *A. ursinum*, fagocitna aktivnost i koncentracija azot-oksida bila je znatno smanjena, pa je pretpostavljeno da ovi ekstrakti inhibiraju ekspresiju ili aktivnost NOS i na taj način sprečavaju razvoj inflamatornog odgovora (Pârvu i drugi 2014).

Fenolna jedinjenja N-kafeoiltilamin i N-feruloiltilamin, izolovana iz *A. sativum* i *A. fistulosum*, pokazali su značajnu inhibitornu sposobnost na aktivnost ciklooksigenaze 1 i 2 (COX-1 i COX-2), veoma slabu sposobnost inhibicije 15-LOX, dok na aktivnost 5-LOX nisu delovali (Park, 2011).

Kim i saradnici (2005) utvrdili su merenjem sposobnosti inhibicije lipoksigenaze (LO) iz soje i hijaluronidaze da flavonoidi izolovani iz listova i izdanaka belog luka ispoljavaju antiinflamatornu aktivnost. Najjaču antiinflamatornu aktivnost ispoljili su kvercetin i njegovi derivati – izokvercitrin i rejnoutrin.

Antiinflamatorna aktivnost *A. ascalonicum* ispitivana je na modelu miša na kome je akutna inflamacija indukovana intraperitonealnom injekcijom sirćetne kiseline, i dokazano je da vodeni ekstrakt značajno inhibira vaskularnu permeabilnost, najverovatnije zahvaljujući inhibiciji oslobađanja inflamatornih medijatora. Poznato je da većina čvrstih tumora pokazuje povećanu vaskularnu permeabilnost, sličnu ili čak višu od tkiva pod upalom. Tumor i upalna tkiva imaju mnoge zajedničke medijatore, kao što su NO, bradikinin (BK) i prostaglandini, čiji je dominantni fiziološki efekat povećanje vaskularne permeabilnosti. Povećana vaskularna permeabilnost tumora i upalnih tkiva može biti osnov za razvoj makromolekularnih lekova selektivanih za određene tumore ili zapaljenske lezije (Mohammadi-Motlagh, 2011).

Vodeni ekstrakti belog i crnog luka pokazali su slabu inhibitornu aktivnost na sintezu tromboksana u trombocitima *in vitro* i tako smanjili agregaciju trombocita indukovanu arahidonskom kiselinom (Srivastava, 1984). U eksperimentu na pacovima, takođe je dokazano da vodeni ekstrakt belog luka aplikovan oralno inhibira ekspresiju COX-2 indukovanu azoksimetanom u ćelijama debelog creva (Sengupta i drugi, 2004). Za razliku od polarnih ekstrakata, nepolarni (hloroformski) ekstrakt crnog luka, izazvao je drastično smanjenje produkcije tromboksana i produkata lipoksigenaze u trombocitima, i tako snažno inhibirao agregaciju trombocita. Ovaj ekstrakt nije imao uticaja na aktivnost fosfolipaze, što znači da nepolarna jedinjenja crnog luka inhibiraju produkciju metabolita arahidonske kiseline u fazama kasnijim od faze oslobađanja arahidonske kiseline iz fosfolipida (Srivastava, 1986). Nepolarni ekstrakti belog luka, međutim, inhibirali su i inkorporaciju arahidonske kiseline u fosfolipide trombocita i degradaciju fosfolipida i aktivnost COX i LOX (Srivastava, 1989) (Slika 2.41.). Trisulfidi izolovani iz nepolarnih frakcija belog i crnog luka pokazali su inhibitorno delovanje na agregaciju trombocita, kao i na sintezu tromboksana, dok su s druge strane indukovali sintezu novih metabolita lipoksigenaznog puta, identifikovanih kao 10-hidroksi-11,12-epoksi-5,8,14-eikozatrienska kiselina (HEPA) i 8,11,12-trihidroksi-5,9,14-eikozatrienska kiselina (THETE) (Makheja i Bailey, 1990). Kasnije je dokazano da je još jedna od aktivnih komponenti belog luka ajoen, za koga je potvrđeno da snažno inhibira i ciklooksigenazni i lipoksigenazni put metabolizma arahidonske kiseline (inhibira sintezu tromboksana A₂ i 12-HETE) (Srivastava i Tyagi, 1993).



Slika 2.41. Šema metaboličke konverzije arahidonske kiseline (AA) u prostaglandine i druge oksidacione produkte u trombocitima. Inhibitorno delovanje crnog i belog luka označeno je sa (-). PL-AA – membranski fosfolipidi sa AA u β -položaju; 12-HPETE – 12-hidroperoksieikozatetraenska kiselina; 12-HETE – 12-hidroksieikozatetraenska kiselina; 12-HHT – 12-hidroksiheptadekatrienska kiselina; MDA – malondialdehid; TBX – tromboksan (Ali i drugi, 2000).

Alicin takođe inhibira agregaciju trombocita ali ne utiče na metabolizam arahidonske kiseline, već najverovatnije utiče na koncentraciju jona kalcijuma (Mayeux i drugi, 1988).

Tiosulfinati i cepaeni izolovani iz crnog luka pokazali su snažno inhibitorno delovanje na 5-LOX iz leukocita i COX iz mikrozoma, čime se objašnjava antiasmatično delovanje crnog luka (Dorsch, 1997). Dokazano je da flavonoli, uključujući kemferol i kvercetin, snažno inhibiraju 5-LOX, čiji produkti 5-HETE i leukotrieni su uključeni u razvoj astme (Aggarwal i drugi, 2006). Lindahl i Tagesson (1997) ispitali su uticaj flavonoida na aktivnost fosfolipaze A₂ (PLA₂) izolovane iz različitih organizama i zaključili da rutin i kvercetin selektivno inhibiraju izotipsku formu II ovog enzima (PLA₂-II). Takođe su zaključili da je za sposobnost flavonoida da inhibiraju PLA₂ neophodno prisustvo nezasićene veze i 4-oksi grupe u prstenu C, dok prisustvo hidroksilnih grupa u 3'- i 4'- položajima prstena B omogućava selektivno inhibitorno delovanje na PLA₂-II. Selloum i saradnici (2003) su kasnije potvrdili antiinflamatornu aktivnost rutina u različitim *in vitro* i *in vivo* eksperimentima.

2.5.4 Antitumorska i antikancerogena aktivnost

Vrste roda *Allium*, naročito beli i crni luk, predmet su intenzivnih istraživanja u pogledu antitumorskog delovanja, još od pedesetih godina prošlog veka, kada su Wisberger i Pensky (1958) prvi put dokazali *in vitro* i *in vivo* da tiosulfinatni ekstrakt belog luka inhibira rast tumorskih ćelija. Od tada su urađene brojne epidemiološke, biohemijske i farmakološke studije, kako bi se ispitalo hemopreventivni i antikancerogeni potencijal *Allium* vrsta (Ip i drugi, 1996; Lawson, 1998; Bianchini i Vainio, 2001; Milner, 2001; Boivin i drugi, 2009). Tako je primećeno da visok unos belog i crnog luka smanjuje rizik od sarkoma i karcinoma različitih tkiva i organa, kao što su želudac, debelo crevo, prostata, bešika, jetra, pluća, koža, mozak (Lau i drugi, 1990; Hu i drugi, 1999; Dorant i drugi, 1996; You i drugi, 1998; Le Marchand i drugi, 2000; Fleischauer i Arab, 2001). Takođe, povećan unos zimskog luka (*A. schoenoprasum*) i vlašca (*A. fistulosum*) ima zaštitni efekat na razvoj raka jednjaka i želuca (Gao i drugi, 1999), a unos praziluka i vlašca smanjuje rizik od raka prostate (Hsing i drugi, 2002). Pretpostavlja se da su za protektivno delovanje vrsta roda *Allium* u prevenciji različitih tipova tumora prvenstveno odgovorna sumporna jedinjenja karakteristična za ovaj rod, a zatim i polifenolna jedinjenja (Fimognari i drugi, 2009; Han i drugi, 2013). Predloženo je nekoliko mogućih mehanizama njihovog hemopreventivnog delovanja, a to su: inhibicija nastanka kancerogena, modulacija metabolizma kancerogena (npr. indukcija enzima II faze detoksifikacije toksičnih materija), inhibicija oksidativnog oštećenja zahvaljujući antioksidantnoj aktivnosti, inhibicija mutageneze, inhibicija formiranja DNA adukata, inhibitorno dejstvo na rast tumora (zaustavljanje ćelijske deobe), inhibicija liooksigenazne i ciklooksigenazne aktivnosti, stimulacija imunog odgovora i indukcija apoptoze (Srivastava, 1986; Srivastava i Justesen, 1989; Perchellet i drugi, 1990; Guyonnet i drugi, 2001; Dirsch i Vollmar, 2001; Izzo i drugi, 2004; Herman-Antosiewicz i Singh, 2004; Corzo-Martinez i drugi, 2007; Fimognari i drugi, 2009; Wu i drugi 2011; Wang i drugi, 2012; Bianchini i Vainio, 2001; Li i drugi, 2002).

Epidemiološke studije pokazale su da je redovna konzumacija belog i drugih lukova koji su zastupljeni u ishrani povezana sa smanjenom prevalencom karcinoma gastrointestinalnog trakta (Witte i drugi, 1996; Lawson, 1998; Gao i drugi, 1999; Bianchini i Vainio, 2001). U još jednoj epidemiološkoj studiji potvrđeno je da postoji inverzna korelacija između unosa crnog luka (kao glavnog izvora kvercetina) i rizika od raka pluća (Le Marchand i drugi, 2000). Njihova zaštitna uloga od nastanka karcinoma želuca i duodenuma delimično se pripisuje antibakterijskom delovanju na *Helicobacter pylori*, bakteriju koja se nalazi u etiologiji ove bolesti (You i drugi, 1998; O'Gara i drugi, 2000). Takođe, organosumporna jedinjenja prisutna u lukovima imaju zaštitnu ulogu od hemijskih kancerogena zahvaljujući svojoj antioksidantnoj aktivnosti i sposobnosti da inhibiraju enzime koji aktiviraju kancerogene (familija citohrom P450 enzima)

(Bianchini i Vainio, 2001; Fleischauer i Arab, 2001; Milner, 2001). Dialil-disulfid i dialil-trisulfid pokazali su sposobnost da moduliraju citohrom P450 posredovanu aktivaciju kancerogena u ćelijama karcinoma jetre (Chun i drugi, 2001). U *in vivo* eksperimentima na životinjama dialil-disulfid ispoljio je inhibitorni potencijal na kancerogenezu debelog creva i bubrega, dok je dialil monosulfid čak pojačao hepatokancerogenezu (Takahashi i drugi, 1992; Reddy i drugi, 1993). Hemopreventivna uloga organosumpornih jedinjenja ogleđa se i u njihovoj sposobnosti da indukuju enzime za detoksikaciju kancerogena, kao što su glutation-S-transferaza (GSH-(S)T), epoksid hidrolaza i glukuronil transferaza, koji inaktiviraju toksične supstance i olakšavaju njihovo izbacivanje iz organizma (Munday i Munday, 1999; Bianchini i Vainio, 2001; Thomson i Ali, 2003). Pokazalo se da i organoselenova jedinjenja prisutna u lukovima imaju mnogo jaču protektivnu ulogu od hemijskih kancerogena u odnosu na sumporna jedinjenja (Ip i drugi 1996; Arnault i Auger, 2006). U eksperimentima na pacovima dokazano je da i rutin ispoljava hemopreventivne osobine, zaustavljajući kancerogenezu indukovanu heterocikličnim aminima (Hirose i drugi, 1999). Takođe je dokazano da kvercetin smanjuje genotoksičnost indukovanu aromatičnim aminima u V79 ćelijama na taj način što inhibira aktivnost CYP1A2 iz familije citohrom-P450 enzima, koji je uključen u bioaktivaciju ovog kancerogena (Lautraite i drugi, 2002).

Inhibicija proliferacije tumorskih ćelija od strane sumpornih jedinjenja lukova dokazana je na većem broju ćelijskih linija uključujući ćelije tumora dojke (Sundaram i Milner, 1993), debelog creva (Sundaram i Milner, 1996), pluća (Sakamoto i drugi, 1997), humanog neuroblastoma (Welch i drugi, 1992), melanoma (Takeyama i drugi, 1993) i karcinoma prostate (Pinto i drugi, 1997). Eatarsko ulje crnog i belog luka snažno inhibira proliferaciju humanih ćelija promijeloidne leukemije (Seki i drugi, 2000), dok ekstrakt belog luka inhibira rast humanih ćelija limfatične leukemije, hepatoma i kolorektalnog karcinoma (Siegers i drugi, 1999). Svež sok crnog luka pokazao je citotoksičnu aktivnost na visoko-rezistentne ćelije leukemije (Votto i drugi, 2010). Vodeni ekstrakt *A. ascalonicum* pokazao je inhibitorno delovanje na proliferaciju ćelija fibrosarkoma miša, humanih T-ćelija akutne leukemije i humanih ćelija eritroleukemije (Mohammadi-Motlagh i drugi, 2011). Glavni mehanizam putem koga organosumporna jedinjenja lukova ispoljavaju antiproliferativno delovanje je zaustavljanje ćelijskog ciklusa u G₂/M fazi (Tapiero i drugi, 2004). Dokazano je da metanolni ekstrakt sremuša (*Allium ursinum*) zaustavlja ćelijsku deobu u G₂/M fazi inhibicijom ciklina B u ćelijama raka želuca što indukuje apoptozu (Xu i drugi, 2003). Hosono i drugi (2005) koji su ispitivali uticaj isparljivih sumpornih jedinjenja belog luka (alil-sulfida) na ćelije humanog adenokarcinoma debelog creva, utvrdili su da broj sumpornih jedinjenja u alil-sulfidu ima važnu ulogu za njegovu antiproliferativnu aktivnost. Naime, dialil-trisulfid pokazao je znatno jaču antiproliferativnu aktivnost u odnosu na dialil-disulfid i dialil-monosulfid. Ovo se objašnjava činjenicom da od svih ispitivanih alil-sulfida, dialil-trisulfid najlakše vrši oksidaciju sulfhidrilnih grupa cisteinskih ostataka β-tubulina, čime je onemogućeno formiranje mikrotubula pa se mitozu zaustavlja. Zaustavljanje ćelijske deobe u M fazi praćeno je indukcijom apoptoze (Filomeni i drugi, 2003). Za S-alilmerkaptocistein (SAMC) dokazano je da smanjuje koncentraciju poliamina, prvenstveno spermina, koji igra važnu ulogu u ćelijskoj deobi i na taj način inhibira proliferaciju tumorskih ćelija (Pinto i drugi, 1997; Li i drugi, 2002). Pored toga, mnoga organosumporna jedinjenja lukova pokazala su sposobnost stimulacije imunog odgovora organizma domaćina. Za ekstrakt belog luka dokazano je da povećava aktivnost NK ćelija, indukuje oslobađanje citokina tipa interleukina (IL)-2, tumor nekroze faktora (TNF)-α i interferona (INF)-γ, pojačava fagocitozu, aktivnost ćelija ubica i imunoproliferaciju limfocita, stimuliše T-helper limfocite (THL) i ukupni ćelijski imuni odgovor, što se može primeniti za antitumorsku imunoterapiju (Kyo i drugi, 1998; Lamm i Riggs, 2001; Thomson i Ali, 2003).

Sa druge strane, tretman ćelija neuroblastoma (SH-SY5Y) dialil-disulfidom može da dovede i do povećane produkcije ROS, što dovodi do indukcije apoptoze preko mitohondrijalnog puta

(Filomeni i drugi, 2003). Sposobnost alil-sulfida da prekidaju ćelijsku deobu i indukuju apoptozu potvrđena je i na drugim humanim kancer ćelijskim linijama (Sundaram i Milner, 1996a; Sakamoto i drugi, 1997; Dirsch i drugi, 1998; Knowles i Milner, 1998; Sigounas i drugi, 1997; Hong i drugi, 2000; Nakagawa i drugi, 2001; Robert i drugi, 2001; Xiao i drugi, 2004; Wu i drugi, 2011). S-alilmerkaptocistein (SAMC) (Sigounas i drugi, 1997) i ajoen (Li i drugi, 2002) indukuju apoptozu u ćelijama leukemije, alicin u nekoliko tumorskih ćelijskih linija (Oommen i drugi, 2004), dok tiosulfinati (S-metil metan-tiosulfinat i S-metil 2-propen-1-tiosulfinat), izolovani iz vrste *Allium tuberosum* inhibiraju proliferaciju i indukuju apoptozu (preko kaspaza-zavisnog i preko kaspaza-nezavisnog puta) u ćelijama humanog adenokarcinoma debelog creva (SW480 i HT-29), humanog karcinoma dojke (MCF7), karcinoma jetre (HepG2) i karcinoma prostate (PC3 i LNCaPcloneFGC) (Park i drugi, 2007; Kim i drugi, 2008; Lee i drugi 2009). U *in vivo* eksperimentima, tretman ovim tiosulfinatima doveo je do značajnog produženja životnog veka miševa inokuliranih tumorskim ćelijama Sarcoma-180 (Park i drugi, 2007).

Sun i Tian su 2009. godine ispitivali uticaj ekstrakata pet vrsta lukova (*A. sativum*, *A. cepa*, *A. fistulosum*, *A. schoenoprasum* i *A. tuberosum*) na enzim sintazu masnih kiselina (FAS), za koju je utvrđeno da se prekomerno ekspresuje kod većine vrsta tumora, i utvrdili da nepolarni ekstrakti snažno inhibiraju ovaj enzim. Zatim su dokazali da etil-acetatni ekstrakt lukovica crnog luka smanjuje ekspresiju FAS u adipocitima i ćelijama karcinoma dojke, što dovodi do nagomilavanja malonil-CoA, koji je okidač apoptoze (Wang i drugi, 2012). S obzirom da je ovaj ekstrakt toksičan i za kancer ćelije i za adipocite, dobar je kandidat za razvoj leka koji istovremeno leči i kancer i gojaznost. Ovo je naročito važno zbog toga što se nastajanje kancera kod velikog broja obolelih pripisuje upravo gojaznosti (Wang i DuBois, 2012). Najnovija istraživanja pokazala su takođe da smeša polifenola (5 glikozida kvercetina i 3 glikozida izoramnetina), dobijena ekstrakcijom liofiliziranih cvetova crnog luka, inhibira rast nekoliko tipova humanih ćelija leukemije, putem kako ekstracelularne tako i intracelularne indukcije kaspaza-zavisne apoptoze (Han i drugi, 2013). Acetonski ekstrakti deset različitih varijeteta crnog luka, pokazali su antiproliferativno delovanje na ćelije humanog hepatokarcinoma (HepG2) i humanog kolorektalnog hepatokarcinoma (Caco-2), pri čemu je utvrđen visok stepen korelacije između sadržaja ukupnih fenola i antiproliferativnog delovanja na HepG2 ćelije (Yang i drugi, 2004). Međutim, pronađene su velike varijacije kako u sadržaju ukupnih fenola i flavonoida tako i u antioksidantnoj i antiproliferativnoj aktivnosti između ispitivanih varijeteta. Takođe, metanolni ekstrakt lukovice crnog luka, u kome su dominantna jedinjenja bili aglikon kvercetin i njegova dva glikozida (kvercetin 3,4'-diglukozid, kvercetin 4-glukozid) ispoljio je citotoksični efekat na ćelije akutne limfocitne leukemije (Fu, 2004). S obzirom da biološka aktivnost derivata kvercetina zavisi od broja slobodnih hidroksilnih grupa (Rice-Evans i drugi, 1996), smatra se da su za antitumorsku aktivnost ekstrakta crnog luka najviše odgovorni aglikon kvercetina i kvercetin 4'-glukozid. Za kvercetin je i ranije dokazano da inhibira rast i indukuje apoptozu u ćelijama leukemije, preko modulacije produkcije TCF- β -1, inhibicije DNA sinteze, inhibicije fosforilaze C i protein kinaze, i zaustavljanja ćelijske deobe u G1 fazi (Uddin i Choudhry, 1995; Yoshida i drugi, 1990; Rong i drugi, 2000). Kvercetin inhibira i DNA-metiltransferaze (DNMT), koje su izrazito aktivne u nekim tumorskim ćelijama, a čija uloga je da vrše metilaciju citozinskog prstena u DNA i time inhibiraju ekspresiju određenih gena (Lee i drugi, 2005). Još jedna zanimljiva aktivnost kvercetina je da poboljšava biološku raspoloživost nekih antikancer lekova, kao što je npr. tamoksifen (nesteroidni antiestrogen za terapiju karcinoma dojke), tako što povećava njegovu intestinalnu apsorpciju i utiče na njegov metabolizam (Shin i drugi, 2006).

Pojedina sumporna jedinjenja lukova sinergistički deluju sa hemoterapeutskim lekovima. Tako ajoeni imaju sposobnost da pojačavaju dejstvo citarabina i fludarabina pospešujući inhibitorno delovanje ovih citostatika na bcl-2 ekspresiju, kao i aktivirajuće delovanje na kaspazu-3

(Ahmed i drugi, 2001; Hassan, 2004). Takođe je dokazano da dialil-disulfid ublažava negativne sporedne efekte citostatika 5-fluorouracila (Sundaram i Milner, 1996b).

Pored sumpornih jedinjenja, i steroidni saponini izolovani iz vrsta *Allium jesdianum* Boiss. et Buhse, *A. karataviense* Regel, *A. macleanii* Bak. i *A. senescens* L. pokazali su citostatski i citotoksični efekat prema nekoliko tumorskih ćelijskih linija (Keusgen, 2002a; Mimaki i drugi, 1999). Steroidni saponin erubozid-B (Amagase, 2006) i fitoaleksin aliksin (Yamasaki i drugi, 1991), pokazuju snažnu antikarcinogenu aktivnost. Organo-Se jedinjenja takođe značajno doprinose antitumorskoj aktivnosti crnog i belog luka (El-Bayoumy i drugi, 2006).

Vrste sekcije *Codonoprasum* roda *Allium* su do sada veoma malo ispitivane u pogledu antitumorske aktivnosti. Metanolni ekstrakt nadzemnih delova biljaka u cvetu vrste *A. flavum* pokazao je izraženu antiproliferativnu aktivnost na ćelijama humanog kolorektalnog karcinoma (HCT-116) (Curcic i drugi, 2012). Pored toga, iz ekstrakta cele biljke *A. flavum* izolovana su tri nova saponina tipa spirostana, koji su pokazali umerenu citotoksičnost na humane kolorektalne kancer ćelije (SW480) (Rezgui i drugi, 2014). Ostale vrste sekcije *Codonoprasum* nisu do sada ispitivane.

2.5.5 Ostale farmakološke aktivnosti

Brojna istraživanja potvrdila su tradicionalnu upotrebu lukova u smanjenju rizika od kardiovaskularnih bolesti (Neil i Silagy, 1994; Yeh i Yeh, 1994). Do nastanka kardiovaskularnih obolenja dovode faktori kao što su povišeni ukupni holesterol u krvi, povišen LDL i povećana LDL oksidacija, povećana agregacija trombocita, hipertenzija, visok nivo homocisteina i inflamacija (Breteler, 2000; Launer, 2002; Borek, 2006). Ovi faktori povećavaju rizik i od nastanka demencije, čija je najčešća forma Alchajmerova bolest. Oksidativni stres je glavni uzrok ovih poremećaja. Akumulacija holesterola, koji primarno potiče iz lipoproteina male gustine (LDL), ispod endotela krvnih sudova, jedan je od osnovnih faktora u procesu nastanka ateroskleroze (Kromhout, 1999; Stocker, 1999). Slobodni kiseonični radikali mogu da dovedu do oksidacije LDL-a. Oksidovani LDL dovodi do oštećenja ćelija endotela, kao i do prokoagulantne aktivnosti na površini endotela i makrofaga, što, uz stimulaciju agregacije trombocita, može dovesti do nastanka kompleksnih aterotomnih naslaga (Berliner i Haberland, 1993; Kromhout, 1999; Brude i drugi, 1997). Aterotomne naslage predstavljaju vodeći faktor rizika za nastanak srčanog udara i ishemije (den Heijer i drugi, 2005; Borek, 2006).

Beli luk ima protektivnu ulogu kod moždanog udara, koronarnih tromboza (Block i drugi, 1986; Ali i drugi, 1990), ateroskleroze (Bordia i drugi, 1977; Fudler, 1989; Turner, 1994; Rahman, 2001; Miller i drugi., 2004), agregacije trombocita (Makheja i Bailey, 1990; Srivastava i Mustafa, 1989; Srivastava i Tayagi, 1993; Ali i drugi, 1999; Thomson i drugi, 2000) i vaskularnih poremećaja (Block i drugi, 1986). Za ovu ulogu prvenstveno je odgovorna antioksidantna aktivnost lukova, koja se ogleda u sposobnosti hvatanja slobodnih radikala, aktivaciji antioksidantnih enzima i inhibiciji lipidne peroksidacije (Dhawan and Jain, 2005). Pored toga, beli luk snižava nivo holesterola u krvi inhibicijom absorpcije u intestinalnom lumenu, za šta su odgovorni steroidni saponini, i inhibicijom 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA reduktaze, ključnog enzima u sintezi holesterola (Matsuura, 2001; Borek, 2006; Ali i Thomson, 1995). U eksperimentima na pacovima dokazano je da i ekstrakti *A. rotundum* subsp. *waldsteinii*, *A. scorodoprasum* i *A. vineale* var. *compactum* dovode do statistički značajnog smanjenja LDL holesterola u krvi i aterosklerotskog indeksa (Božin, 2009). Beli luk takođe inhibira i apsorpciju triglicerida, oksidaciju LDL-a i agregaciju trombocita, povećava fibrinolizu, a samim tim sprečava nastajanje aterosklerotičnog plaka (Lawson, 1998; Srivastava i Justensen, 1989). Za ovu aktivnost delimično je odgovorno jedinjenje S-metilcistein sulfoksid (Sainani i drugi, 1979; Warshafsky i

drugi, 1993; Augusti, 1996). Za tiosulfinate (dialil-, dimetil- i dipropil-tiosulfinat) prisutne u mnogim vrstama roda *Allium* takođe je dokazana antiagregacijska aktivnost i to putem inhibicije indukcije agregacije kalpainom (Rendu i drugi, 2001). Takođe, dokazano je da je kvercetin dobar inhibitor agregacije trombocita jer modifikuju metabolizam cikličnog ATP-a inhibicijom fosfodiesteraze (Landolfi i drugi, 1984). Beli luk smanjuje koncentraciju homocisteina, snižava krvni pritisak i poboljšava mikrocirkulaciju (Lawson, 1998). Takođe, beli luk ima protektivnu ulogu i kod cerebrovaskularnih bolesti, jer štiti neurone od amiloid-beta (A beta) neurotoksičnosti i apoptoze, čime sprečava neuronsku smrt (Gupta i drugi, 2003). Na taj način beli luk poboljšava sposobnost učenja i memoriju, smanjuje rizik od demencije i Alchajmerove bolesti (Borek, 2006). *Allium ursinum* ispoljava takođe antiagregacionu sposobnost, pri čemu su β -sitosterol-3-O- β -D-glukozid i 1- β -D-galaktopiranozid-2,3-bis-linolenil glicerat identifikovani kao aktivni principi (Sabha, 2011).

Crni luk ima potencijalnu primenu i kod drugih metaboličkih oboljenja kao što su dijabetes i hiperlipidemije. Kod dijabetičara, redovan unos crnog luka smanjuje potrebu za antidijabetskim lekovima zahvaljujući prisustvu S-metilcistein sulfoksida, za koga je dokazano da nakon oralne primene značajno smanjuje hiperglikemiju (Kumari i drugi, 1990). Novija istraživanja pokazala su da ekstrakt *A. cepa* sprečava i nastanak osteoporoze, tako što inhibira resorpcionu aktivnost osteoklasta, a da je jedinjenje odgovorno za ovu aktivnost γ -L-glutamil-trans-S-1-propenil-L-cistein sulfoksid (Mühlbauer i Li, 1999; Mühlbauer i drugi, 2002; Wetli i drugi, 2005). Nađeno je da eskalonikozidi A1, A2 i B, izolovani iz crnog luka, pokazuju spazmolitičko delovanje u eksperimentima na tankom crevu zamorčeta, što objašnjava tradicionalnu upotrebu crnog luka u tretmanu poremećaja gastrointestinalnog trakta (Corea, 2005). U eksperimentima na pacovima dokazana je i antidepresantna aktivnost crnog luka (Sakakibara i drugi, 2008). Takođe, ekstrakti *A. scorodoprasum*, *A. sphaerocephalon*, *A. guttatum* subsp. *dalmaticum* i *A. vineale* ispoljili su značajan inhibitorni efekat na aktivnost enzima monoaminoooksidaze (MAO), što ukazuje na njihovu potencijalnu primenu kao antidepresiva ili u lečenju Parkinsonove i Alchajmerove bolesti (Božin, 2009).

3. Eksperimentalni deo

3.1 SPECIFIČNE HEMIKALIJE I REAGENSI KORIŠĆENI U EKSPERIMENTIMA

Od Sigma-Aldrich Chemicals (Steinheim, Germany) nabavljene su sledeće hemikalije: acetilsalicilna kiselina (aspirin), 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroksitoluen (BHT), 5,5-dimetil-1-pirolin-N-oksidi (DMPO), 12(*S*)-hidroksi-(5*Z*,8*E*,10*E*)-heptadekatrien-kiselina (12-HHT), 12(*S*)-hidroksi-(5*Z*,8*Z*,10*E*,14*Z*)-eikozatetraen-kiselina (12-HETE), tromboksan B₂ (TXB₂), prostaglan E₂ (PGE₂), prostaglandin B₂ (PGB₂), kalcijumova jonofora A23187 (kalcimicin), tris[hidroksimetil]aminometan (TRIS), etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA), sulforodamin B, Triton X-100, *tert*-butil-hidroperoksid (*t*-BOOH), hinska kiselina, katehin, *p*-O-kafeoilhinska kiselina (hlorogenska kiselina), galna kiselina, epikatehin, 2,5-dihidroksibenzoeva kiselina, *p*-hidroksibenzoeva kiselina, siringinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, umbeliferon, skopoletin, viteksin, sinapinska kiselina, *o*-kumarinska kiselina, miricetin, kvercitrin, 3,4-dimetoksicimetna kiselina, bajkalin, daidzein, kvercetin, cimetna kiselina, genistein, izoramnetin, bajkalein, amentoflavon, ekstrakt kvasca. Folin-Ciocalteu (FC) reagens poručen je od Fisher Scientific (Leicestershire, UK). 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), 2-tiobarbiturna kiselina (TBA), sulfanilamid, vanilinska kiselina, ferulna kiselina, sekoizolaricirezinol, matairezinol, naringenin i rutin nabavljeni su od Fluka Chemie GmbH (Buchs, Switzerland). Trihlorsirćetna kiselina i D-glukoza monohidrat su poručeni od Lach-Ner sro (Neratovice, Czech Republic), natrijum-nitroprusid od Reanal (Budapest, Hungary), a *N*-(1-naftil)etilendiamin dihidrohlorid (NEDA) i askorbinska kiselina od Merck (Darmstadt, Germany). Tween-80 i svi korišćeni rastvarači kupljeni su od J. T. Baker (Deventer, Germany). Standardi kafena kiselina, luteolin i apigenin poručeni su od ChromaDex (Santa Ana, CA), a protokatehinska kiselina, epigalokatehin galat, eskuletin, hiperozid, kvercetin-3-*O*-glukozid, apiin, kemferol-3-*O*-glukozid, kemferol, krizoeriol, luteolin-7-*O*-glukozid i apigenin-7-*O*-glukozid od Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany). Penicilin i streptomycin nabavljeni su od Galenike (Beograd, RS). Od PAA Laboratories GmbH (Pasing, Austria) nabavljeni su fetusni goveđi serum (FBS), osnovni medijum DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium) bez L-glutamina sa 4,5 g/L glukoze, fosfatni pufer (Dulbecco's PBS (10×) (pH 6.5) bez kalcijuma i magnezijuma), tripsin je kupljen od Serva (Heidelberg, Germany), NMP (Normal melting point) agarozna od Eurobio Laboratories (Courtaboeuf, France), a LMP (Low melting point) agarozna i etidijum bromid od BioRad Laboratories, Inc. (Hercules California, USA). Tripianplavo (Direct Blue 14) poručeno je od TCI Europe N.V. (Zwijndrecht, Belgium), Mueller Hinton broth i Mueller Hinton agar od Oxoid, Hampshire, UK, Luria-Bertani bujon od HiMedia (Mumbai, India), a tripton i agar od Lab M Limited (Lancashire, UK). Ostali reagensi bili su analitičke čistoće.

3.2 BILJNI MATERIJAL

Biljni materijal, korišćen za istraživanja u ovom radu, sakupljen je na području Republike Srbije, u periodu 2009–2012. godine i obuhvatao je predstavnike odabranih vrsta roda *Allium* sect. *Codonoprasum* (*Prilog 7.1.*). Materijal je uzet sa originalnih staništa u fenofazi cvetanja, determinisan od strane dr Gorana Anačkova i deponovan u herbarijumu Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, Republika Srbija (BUNS Herbarium). Detaljne informacije o uzorcima biljnog materijala (lokaliteti, vreme sakupljanja, oznake vaučera) date su u *Tabeli 7.1. u Prilogu.*

Uzorci za *headspace* GC-MS analizu i metodu određivanja aktivnosti alinaze čuvani su u plastičnim vrećama na 4 °C najduže 10 dana do momenta analize. Svi ostali uzorci osušeni su na

vazduhu na sobnoj temperaturi i čuvani u papirnim vrećama na tamnom i suvom mestu do momenta ekstrakcije.

3.3 PRIPREMA EKSTRAKATA

3.3.1 Metanolni ekstrakti

Odmerena masa osušenog i samlevenog biljnog materijala (*Tabela 3.1* i *3.2*) macerirana je sa 70% (v/v) metanolom (~8 mL MeOH po 1 g droge) u toku 72 časa na sobnoj temperaturi uz mućkanje. Nakon ceđenja preko Büchner-ovog levka ekstrakti su upareni do suva na rotacionom vakuum uparivaču na temperaturama manjim od 45 °C da bi se izbegla degradacija termolabilnih prirodnih proizvoda, a zatim dodatno sušeni u vakuum-eksikatoru, na sobnoj temperaturi, do konstantne mase. Izmerena je masa suvog ostatka i izračunat prinos (*Tabele 3.1* i *3.2*). Suvi ostatak je zatim rastvaran u nekoliko različitih rastvarača:

- u 70% metanolu, pri čemu su napravljeni osnovni rastvori koncentracije 200 mg mL⁻¹, koji su korišćeni za određivanje ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, LC-DAD-MS i LC-MS-MS analize, kao i za ispitivanje antioksidantnog, antimikrobnog, antiviralnog i antimutagenog potencijala ekstrakata,
- u sterilnoj destilovanoj vodi, pri čemu su napravljeni osnovni rastvori koncentracije 200 mg/mL, koji su korišćeni za određivanje antimikrobnog potencijala ekstrakata,
- u destilovanoj vodi, da bi se dobili rastvori koncentracije 100 mg mL⁻¹ koji su korišćeni za ispitivanje sposobnosti hvatanja hidroksil radikala ESR tehnikom
- u DMSO, pri čemu su napravljeni osnovni rastvori koncentracije 300 mg mL⁻¹, koji su korišćeni za ispitivanje antiinflamatornog potencijala, citotoksičnosti i genotoksičnosti.

Pripremljeni MeOH i DMSO rastvori čuvani su u zatvorenim staklenim vialima na 4 °C, a vodeni na -20 °C do momenta analize.

Tabela 3.1. Metanolni ekstrakti korišćeni za kvantitativnu analizu odabranih fenolnih jedinjenja LC-MS/MS tehnikom

Vrsta	Lokalitet	Deo biljke	m _{droga} [g]	m _{ekstrakt} [g]	Prinos [%]
<i>A. flavum</i>	Vršački breg	lukovice	2,91	0,1067	3,67
		nadzemni deo	2,76	0,1946	7,05
	Dimitrovgrad	lukovice	1,57	0,3251	20,7
		nadzemni deo	2,40	0,1713	7,14
	Klisura Jerme	lukovice	7,46	1,6255	21,8
		nadzemni deo	4,3	0,3716	8,64
	Babušnička reka	lukovica	10,0	1,9734	19,7
		nadzemni deo	5,00	0,3523	7,05
<i>A. oleraceum</i>	Kosmovac	lukovica	2,02	0,2757	13,6
		nadzemni deo	2,71	0,1791	6,61
<i>A. melanantherum</i>	Plana	lukovica	5,77	1,2169	21,1
		nadzemni deo	2,76	0,2726	9,88
	Plana, livada	nadzemni deo	3,72	0,1055	2,84
	Čemernik	lukovica	5,99	1,4357	24,0
nadzemni deo		2,17	0,1518	7,00	

Vrsta	Lokalitet	Deo biljke	m _{droga} [g]	m _{ekstrakt} [g]	Prinos [%]
<i>A. pallens</i>	Beli Rzav	lukovica	1,87	0,3949	21,1
		nadzemni deo	0,80	0,0505	6,31
<i>A. rhodopeum</i>	Dimitrovgrad	lukovica	3,59	0,5856	16,3
		nadzemni deo	3,99	0,3357	8,41
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchelum</i>	Vlasinsko jezero	lukovica	1,52	0,3453	22,7
		nadzemni deo	2,96	0,3622	12,2
	Tara	lukovica	5,28	1,1365	21,5
		nadzemni deo	2,08	0,3070	14,8
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i>	Čemernik	lukovica	3,01	0,6922	23,0
		nadzemni deo	5,67	0,5014	8,84
	Tara	lukovica	2,51	0,5406	21,5
		nadzemni deo	2,25	0,1856	8,25
<i>A. fuscum</i> subsp. <i>fuscum</i>	Zaovine	lukovica	2,20	0,9163	41,6
		nadzemni deo	2,77	0,4041	14,6
	Beli Rzav	lukovica	1,53	0,355	23,2
		nadzemni deo	4,99	0,6405	12,8
	Derventa	lukovica	2,75	0,5260	19,1
		nadzemni deo	2,42	0,2017	8,33
<i>A. fuscum</i> subsp. <i>gracile</i>	Tara	lukovica	1,57	0,2912	18,5
		nadzemni deo	1,56	0,1431	9,17
<i>A. paniculatum</i>	Titelski breg	lukovica	1,87	0,4744	25,4
		nadzemni deo	2,67	0,4501	16,9

Tabela 3.2. Metanolni ekstrakti korišćeni za određivanje ukupnih fenola i ukupnih flavonoida i za ispitivanje antioksidantnog, antiinflamatornog, antimikrobnog, antiviralnog, i antimutagenog potencijala

Vrsta	Lokalitet	Deo biljke	m _{droga} [g]	m _{ekstrakt} [g]	Prinos [%]
<i>A. flavum</i>	Vršački breg	cela biljka	60,0	7,008	11,68
	Bela Palanka	cela biljka	70,0	12,08	17,26
	Dimitrovgrad	cela biljka	3,51	0,507	14,44
	Klisura Jerme	cela biljka	29,8	5,090	17,08
	Mokra Gora	cela biljka	13,1	2,057	15,70
	Babušnička reka	cela biljka	101	13,43	13,30
	Bela Palanka	nadzemni deo	17,9	1,790	10,00
<i>A. oleraceum</i>	Kosmovac	cela biljka	14,2	1,866	13,14
<i>A. melanantherum</i>	Plana	cela biljka	100	15,33	15,33
	Čemernik	cela biljka	15,8	3,778	23,91
<i>A. pallens</i>	Beli Rzav	cela biljka	17,1	4,587	26,82
<i>A. rhodopeum</i>	Dimitrovgrad	cela biljka	71,4	10,37	14,52
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchelum</i>	Vlasinsko jezero	cela biljka	43,0	9,126	21,22
	Tara	cela biljka	9,04	1,532	16,95
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i>	Čemernik	cela biljka	98,1	22,54	22,98
	Tara	cela biljka	6,79	0,923	13,59
<i>A. fuscum</i> subsp. <i>fuscum</i>	Zaovine	cela biljka	12,6	1,972	15,65
<i>A. paniculatum</i>	Titelski breg	cela biljka	28,0	6,905	24,66
<i>A. cepa</i>	Neradin	cela biljka	62,8	4,773	7,60
<i>A. sativum</i>	Šajkaš	cela biljka	58,8	13,80	23,47

3.3.2 Ekstrakti za određivanje antocijana

Odmerena masa osušenih i usitnjenih cvasti (*Tabela 3.3*) macerirana je rastvorom za ekstrakciju (34,3 mL vode : 34,3 mL MeOH : 1,4 mL ccHCl) (~7 mL rastvora za ekstrakciju po 1 g droge) u toku 24 h na sobnoj temperaturi uz mućkanje. Nakon ceđenja preko Büchner-ovog levka ekstrakti su upareni do suva na rotacionom vakuum uparivaču na temperaturama manjim od 40 °C. Izmerena je masa suvog ostatka i izračunat prinos (*Tabela 3.3*). Suvi ostatak je zatim rastvoren u 50% (v/v) MeOH da bi se dobili rastvori koncentracije 100 mg mL⁻¹, koji su odmah korišćeni za određivanje ukupnih monomernih antocijana.

Tabela 3.3. Ekstrakti cvasti za određivanje ukupnih monomernih antocijana

Vrsta	Lokalitet	m _{droga} [g]	m _{ekstrakt} [mg]	Prinos [%]
<i>A. flavum</i>	Vršački breg	5,50	669,5	12,17
	Dimitrovgrad	2,33	392,9	16,86
	Klisura Jerme	2,40	370,4	15,43
<i>A. oleraceum</i>	Kosmovac	2,91	217,6	7,48
<i>A. melanantherum</i>	Plana	2,47	1007	40,78
	Čemernik	2,74	932,0	34,01
<i>A. pallens</i>	Beli Rzav	1,53	384,5	25,13
<i>A. rhodopeum</i>	Dimitrovgrad	3,64	518,1	14,23
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchellum</i>	Vlasinsko jezero	3,18	553,6	17,41
	Tara	3,08	476,9	15,48
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i>	Čemernik	2,96	941,7	31,81
	Tara	2,70	1069	39,60
<i>A. fuscum</i> subsp. <i>fuscum</i>	Derventa	2,68	282,6	10,54
	Zaovine	2,77	476,4	17,20
<i>A. paniculatum</i>	Titelski breg	4,65	612,8	13,18

3.4. HEADSPACE GC-MS (HS-GC-MS) ANALIZA VOLATILNIH KOMPONENTI

Isparljiva sumporna jedinjenja nastala nakon dezintegracije ćelija lukovice analizirana su primenom HS-GC-MS tehnike. Sveže lukovice (od 0,5 g do 2,5 g u zavisnosti od intenziteta mirisa) su usitnjene i stavljene u vijale od 20 mL, koje su odmah nakon toga zatvarane i postavljane na *headspace* autosempler (Agilent Technologies 7694E) gasnog hromatografa (Agilent Technologies 6890N) sa masenim spektrometrom (Agilent Technologies 5975B). Parametri HS autosemplera bili su: temperatura vijala 90 °C, vreme termostatiranja 10 min, vreme postizanja pritiska helijuma u vijalu 0,15 min, temperatura petlje 105 °C, vreme punjenja petlje 0,15 min, vreme uravnotežavanja petlje 0 min, temperatura transfer-linije 115 °C, vreme injektovanja 1,00 min i temperatura GC inleta 250 °C. Početna temperatura kapilarne kolone HP-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, Agilent Technologies) postavljena je na 50 °C i brzinom od 8 °C/min podizana do 120 °C, a zatim brzinom od 15 °C/min do 169 °C. Kao gas nosač korišćen je helijum čistoće 99,999%, u režimu konstantnog protoka od 1,0 mL/min. Komponente su razdvojene na HP-5ms (Agilent Technologies) kapilarnoj koloni dimenzija 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, uz temperaturni program: startna temperatura 50 °C, 8 °C/min do 120 °C, 15 °C/min do 169 °C. Razdvojene komponente su analizirane na masenom spektrometru (temperatura transfer linije 280 °C, temperatura jonskog izvora 230 °C, energija elektrona 70 eV, temperatura kvadrupola 150 °C) u sken modu, u *m/z* opsegu 35–400. U cilju bolje korelacije masenih spektara sa spektralnim bibliotekama, instrument je tjuniran korišćenjem *Standard spectra tune-a*.

Podaci su obrađeni pomoću Agilent Technologies MSD ChemStation softvera (revizija E01.01.335). Za identifikaciju masenih spektara korišćena je spektralna biblioteka Wiley Registry of Mass Spectral Data 7th Edition (338000 spektara, 289000 jedinjenja). Relativni udeli jedinjenja određeni su metodom normalizacije, na osnovu površine pikova u TIC (*total ion chromatogram*).

3.5. LC-DAD-MS I LC-MS-MS ANALIZA

Scan analiza

Komponente ispitivanih ekstrakata analizirane su tehnikom tečne hromatografije kuplovane sa UV/VIS detekcijom (diode array detector, DAD) i tandemskom masenospektrometrijskom detekcijom. Korišćen je Agilent Technologies 1200 Series Rapid Resolution tečni hromatograf (sastavljen od G1379B vakuum-degazera, G1312B binarne pumpe, G1367C autosemplera, G1316B termostatanog odeljka za kolone i G1315C DAD detektora) kuplovan sa G6410A QqQ MS-MS detektorom sa elektrosprej (ESI) jonskim izvorom. Za kontrolu instrumenta i akviziciju podataka korišćen je MassHunter Workstation Data Acquisition ver. B.01.03 softver (Agilent Technologies).

Injektovano je 10 μL uzorka dobijenog razblaživanjem osnovnog rastvora ekstrakta (200 mg mL^{-1} u 70% metanolu) mobilnom fazom (faze A i B u odnosu 1:1) do koncentracije od 20 mg mL^{-1} i filtriranjem kroz membranski filter (Membrane Econofilters prečnika 25 mm i sa veličinom pora od 45 μm). Kao mobilna faza A korišćena je 0,05% v/v mravlja kiselina, a kao faza B – metanol. Komponente su eluirane u gradijentnom režimu: 0 min 80 % B, 7 min 40 % B, 15 min 90 % B, 18 min 90 % B, post time 3 min (ukupno vreme analize 21 min), uz konstantan protok od 1 mL min^{-1} . Komponente su razdvajane na Rapid Resolution HT Zorbax Eclipse XDB-C18 50 mm \times 4,6 mm, 1,8 μm koloni (Agilent Technologies) temperiranoj na 40 °C. Praćen je UV/VIS signal efluenta na 254 nm, 290 nm i 340 nm (za sve signale, širina trake bila je 16 nm). Istovremeno su snimljeni i kontinualni UV/VIS spektri u opsegu od 190–400 nm (sa korakom 2 nm).

Eluirane komponente su jonizovane u ESI jonskom izvoru u pozitivnom modu, uz pritisak gasa za nebulizaciju od 40 psi, protok gasa (N_2) za sušenje od 9 L/min i temperaturu gasa od 350 °C, i napon na kapilari od 4 kV. Za monitoring nastalih jona korišćen je pozitivni MS2Scan mod (kvadrupol Q1 podešen na transmisiju, koliziona ćelija isključena, kvadrupol Q3 podešen na skeniranje), uz m/z opseg od 110–800 Da (korak 0,1 Da), sa vremenom skeniranja od 200 ms i pri naponu fragmentora od 100 V.

Obrada hromatograma vršena je pomoću programa Mass Hunter Qualitative Analysis verzija B.01.03, kojim su dobijeni karakteristični maseni i UV spektri komponenata ekstrakata. Identifikacija komponenata vršena je poređenjem dobijenih podataka sa podacima za standarde flavonoida i fenolnih kiselina i sa literaturnim podacima, kao i interpretacijom spektara.

MSⁿ analiza

U cilju identifikacije pojedinih komponenti, odabrane jonske vrste u reprezentativnim uzorcima analizirane su korišćenjem sledećih MSⁿ tehnika:

– Product Ion Scan (Q1 podešen na propuštanje samo odabrane jonske vrste – SIM, koliziona ćelija uključena, Q3 – skeniranje), uz kolizionu energiju variranu u opsegu 0–40 V (sa korakom 10 V), pri čemu su dobijeni MS² i pseudo-MSⁿ spektri. Kao kolizionni gas korišćen je azot visoke čistoće.

– Precursor Ion Scan (Q1 – skeniranje, koliziona ćelija uključena, Q3 – SIM) korišćen je za skrining molekula sa zajedničkim strukturnim elementima. Praćeni su joni flavonoidnih aglikona

(kemferola i luteolina ($m/z = 287$ u pozitivnom modu), metil-kveretina ($m/z = 317$ u pozitivnom modu). Napon fragmentora podešen je na 100 V, a napon kolizione ćelije na 20 V.

Za obradu podataka korišćen je softver MassHunter Qualitative Analysis ver. B.01.03 (Agilent Technologies). Za identifikaciju su korišćeni podaci o molskoj masi, karakteristični fragmenti u MS^n spektrima, UV spektri, poređenje sa referentnim standardima (ukoliko su dostupni), prethodno objavljeni rezultati i baza podataka Dictionary of Natural Products (Buckingham, 2007).

3.6. KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE ODABRANIH FENOLNIH JEDINJENJA LC-MS/MS TEHNIKOM

Sadržaj hinske kiseline i 44 odabrana fenolna jedinjenja (14 fenolnih kiselina, 25 flavonoida, 3 kumarina i 2 lignana) u ispitivanih ekstraktima određen je primenom LC-MS-MS tehnike (Orčić i drugi, 2014). Za analizu je korišćen Agilent 1200 tečni hromatograf (vakuum degazer, binarna pumpa, autosempler i termostatirana komora za kolonu) kuplovan sa Agilent G6410A QqQ tandemskim masenim spektrometrom i elektrosprej (ESI) jonskim izvorom. Analiti su razdvojeni primenom Zorbax Eclipse XDB-C18 RR 4,6 mm \times 50 mm, 1,8 μ m (Agilent Technologies, USA) reverzno-fazne kolone. Za kontrolu instrumenta i obradu rezultata korišćen je program MassHunter ver. B.03.01. (Agilent Technologies, USA). Injektovana zapremina svih uzoraka je bila 5 μ L. Binarna mobilna faza sastojala se od faze A (0,05% mravlje kiseline) i faze B (metanola), protok je iznosio 1 mL min^{-1} , a temperatura kolone 45 $^{\circ}\text{C}$. Primenjen je gradijentni mod, koji je podrazumevao sledeći odnos faza: 0 min 30% B, 6 min 70% B, 9 min 100% B, 12 min 100% B, sa vremenom reekvilibracije od 3 min. Eluat je prosleđen bez deljenja toka na ESI jonski izvor, čiji su parametri bili: temperatura gasa za sušenje (N_2) 350 $^{\circ}\text{C}$, protok 9 L min^{-1} , pritisak gasa za raspršivanje 40 psi, napon na kapilari 4 kV, negativan polaritet.

Optimizovani MS/MS parametri, specifični za ispitivana jedinjenja, dati su u *Tabeli 3.4*.

Tabela 3.4. LC-MS/MS parametri za standardna jedinjenja

Jedinjenje	Retenciono vreme (min)	Napon fragmentora (V)	Jon prekursor (m/z)	Jon proizvod (m/z)	Koliziona energija (V)
<i>galna kiselina</i>	0,58	90	169	125	10
<i>katehin</i>	0,74	150	289	245	10
<i>protokatehinska kiselina</i>	0,79	105	153	109	9
<i>5-O-kafeoilhinska kiselina</i>	0,80	100	353	191	10
<i>epigalokatehin galat</i>	0,81	165	457	169	16
<i>epikatehin</i>	0,95	150	289	245	10
<i>2,5-dihidroksibenzoeva kiselina</i>	1,03	100	153	109	9
<i>p-hidroksibenzoeva kiselina</i>	1,08	80	137	93	10
<i>eskuletin</i>	1,13	105	177	133	15
<i>kafena kiselina</i>	1,18	100	179	135	10
<i>vanilinska kiselina</i>	1,24	100	167	108	15
<i>siringinska kiselina</i>	1,31	90	197	182	7
<i>p-kumarinska kiselina</i>	1,69	90	163	119	9
<i>umbeliferon</i>	1,73	120	161	133	19
<i>skopoletin</i>	1,77	80	191	176	8
<i>ferulna kiselina</i>	1,90	90	193	134	11
<i>viteksin</i>	1,90	200	431	311	22

Jedinjenje	Retenciono vreme (min)	Napon fragmentora (V)	Jon prekursor (m/z)	Jon proizvod (m/z)	Koliziona energija (V)
<i>sinapinska kiselina</i>	1,92	100	223	193	17
<i>luteolin-7-O-glukozid</i>	2,13	230	447	285	30
<i>hiperozid</i>	2,16	200	463	300	30
<i>kvercetin-3-O-glukozid</i>	2,25	210	463	300	30
<i>rutin</i>	2,33	135	609	300	42
<i>apiin</i>	2,60	250	563	269	36
<i>o-kumarinska kiselina</i>	2,62	100	163	119	5
<i>miricetin</i>	2,67	150	317	179	20
<i>kvercitrin</i>	2,75	190	447	300	27
<i>kemferol-3-O-glukozid</i>	2,80	190	447	284	30
<i>apigenin-7-O-glukozid</i>	2,81	135	431	268	41
<i>sekoizolaricirezinol</i>	2,90	130	361	165	26
<i>3,4-dimetoksicimetna kiselina</i>	2,99	110	207	103	7
<i>bajkalin</i>	3,40	140	445	269	22
<i>daidzein</i>	3,43	145	253	208	31
<i>matairezinol</i>	3,66	130	357	122	24
<i>kvercetin</i>	3,74	130	301	151	15
<i>naringenin</i>	3,87	130	271	151	16
<i>cimetna kiselina</i>	3,91	100	147	103	5
<i>luteolin</i>	4,03	135	285	133	25
<i>genistein</i>	4,12	145	269	133	32
<i>kemferol</i>	4,55	130	285	285	0
<i>apigenin</i>	4,71	130	269	117	25
<i>izoramnetin</i>	4,79	160	315	300	21
<i>hrizoeriol</i>	4,82	125	299	284	20
<i>bajkalein</i>	5,15	165	269	269	0
<i>amentoflavon</i>	5,78	220	537	375	35

Jedinjenja su praćena u dinamičkom SRM (*selected reactions monitoring*) modu. Osnovni standardi pripremljeni su rastvaranjem čistih supstanci u DMSO do koncentracije od tipično 10 mg mL⁻¹. Osnovni miks standarda pripremljen je mešanjem osnovnih standarda i razblaživanjem tako da koncentracija svake komponente u njemu bude 100 µg mL⁻¹. Napravljena je serija razblaženja ovog rastvora tako da pojedinačne koncentracije standarda budu u opsegu od 0,0015 do 25,0 µg mL⁻¹. Određivanje sadržaja odabranih fenolnih jedinjenja u ispitivanim ekstraktima je izvršeno metodom eksternog standarda, na osnovu kalibracionih krivih – funkcija logaritma površine pika u zavisnosti od logaritma koncentracije standarda, $\log(A) = f(\log(C))$. Za konstruisanje krivih i očitavanje koncentracija korišćen je softver *Origin 8.0* (OriginLab, USA). Rezultati su izraženi kao koncentracija [mg/g suvog ekstrakta] ± standardna devijacija ponovljivosti (dobijena u toku validacije metode).

Za analizu glavnih komponenti (PCA) korišćen je softver PAST (Paleontological Statistics) ver. 2.16 (Hammer i drugi, 2001).

3.7 ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH MONOMERNIH ANTOCIJANA

Princip:

Određivanje sadržaja ukupnih monomernih antocijana zasniva se na njihovoj osobini da pri promeni pH vrednosti sredine reverzibilno menjaju svoju strukturu, pri čemu dolazi i do promene apsorpcionog spektra (Lee i drugi, 2005). Obojeni oksonijum oblik sa maksimumom apsorpcije na 520 nm, postoji na pH=1, a bezbojna hemiketalna forma dominira na pH=4,5. Koncentracija monomernih antocijana proporcionalna je razlici između apsorbcije očitane pri pH=1 i pri pH=4,5 na 520 nm. Rezultati su izraženi u ekvivalentima cijanidin-3-glukozida. Tokom vremena, kao i pod uticajem raznih faktora (temperatura, kiseonik, vitamin C i dr.) dolazi do degradacije monomera antocijana, i međusobnog povezivanja ovih degradacionih proizvoda, pri čemu se formiraju kondenzacioni proizvodi degradacije. Degradirani antocijani u polimernom obliku ne menjaju boju prilikom promene pH jer apsorbuju na pH=4,5 isto kao i na pH=1.

Reagensi

1. pufer pH=1 (0,025 M KCl): 0,186 g KCl rastvoreno je u 98,0 mL dH₂O, a potom sa HCl podešen pH na 1 i dopunjeno sa dH₂O do 100 mL.
2. pufer pH=4,5: 5,443 g CH₃COONa rastvoreno je u 96,0 mL dH₂O, podešen pH sa CH₃COOH i dopunjeno sa dH₂O do 100 mL.

Postupak

Odmereno je po 0,25 mL ili 0,50 mL 10% ekstrakta i dopunjeno do 5 mL puferom pH=1. U drugu epruvetu odmereno je isto toliko 10% ekstrakta i dopunjeno do 5 mL pH=4,5. Sve probe su pripremljene u tri ponavljanja i nakon 10 min inkubacije po 300 µL iz svake probe preneto je u mikroploču, nakon čega je izmerena apsorbcija na 520 nm i na 700 nm pomoću Multiscan Spectrum čitača mikroploča (Thermo Corporation). Merenje na 700 nm izvršeno je radi korekcije zamućenja. Kod ekstrakata kod kojih je nakon mešanja sa puferom došlo do jakog zamućenja, izvršeno je centrifugiranje na 3500 o/min (15 min) pre merenja apsorbcije. Kao slepa proba korišćena je destilovana voda.

Izračunavanje

Koncentracija ukupnih monomernih antocijana u ekstraktu irračunata je prema formuli:

$$C_{uk} [mg L^{-1}] = (A_{mon} \times M \times F \times 1000) / (\epsilon \times l)$$

gde je:

A_{mon} apsorbancija izračunata prema formuli:

$$A_{mon} = (A_{520} - A_{700})_{pH1} - (A_{520} - A_{700})_{pH4,5}$$

$M = 449,2 \text{ g mol}^{-1}$ (molekulska masa cijanidin-3-glukozida)

$F = 20$ (faktor razblaženja ekstrakta)

$\epsilon = 26900 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ (molarni apsorpcioni koeficijent cijanidin-3-glukozida)

$l = 0,80 \text{ cm}$ (put svetlosti kroz ćeliju mikroploče)

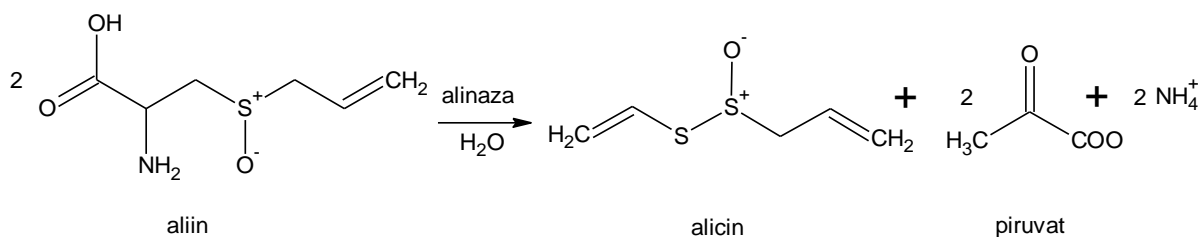
Dobijena koncentracija ekvivalenata galne kiseline u svakom ekstraktu preračunata je na masu suvog ekstrakta. Sadržaj monomernih antocijana u ekstraktima izražen je u mg ekvivalenata

cijanidin-3-glukoziđa po gramu suvog ekstrakta i dat kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija.

3.8 ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ALIINAZE

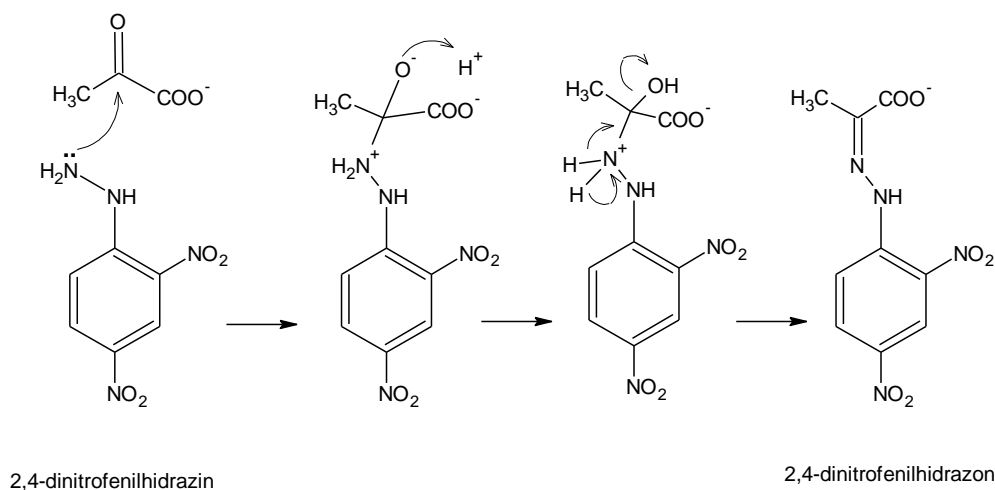
Princip:

Enzimi iz grupe aliinaza nalaze se u većini, ako ne i u svim vrstama roda *Allium* (Brewster i Rabinowich, 1990). Aktivnost enzima aliinaze određena je spektrofotometrijskom metodom (Schwimmer i Weston, 1961; Anthon i Barrett, 2003), koja se zasniva na merenju koncentracije nastalog piruvata. Piruvat nastaje delovanjem aliinaze na *S*-alk(en)il-L-cistein sulfokside (Slika 3.1.), kada se gnječenjem, seckanjem ili žvakanjem luka naruše njegove ćelijske strukture i iz vakuola oslobodi ovaj enzim.



Slika 3.1. Prevođenje aliina u alicin delovanjem aliinaze

Nastali piruvat u reakciji sa 2,4-dinitrofenilhidrazinom u kiseljoj sredini daje talog dinitrofenilhidazona (Slika 3.2.), koji se u baznoj sredini rastvara dajući braon obojeni rastvor, čija se apsorbancija meri na 445 nm.



Slika 3.2. Reakcija piruvata sa 2,4-dinitrofenilhidrazinom

Ova metoda je veoma brza i često se koristi za merenje jačine arome luka. Međutim, ovom metodom se ne dobijaju informacije o relativnoj količini pojedinačnih prekursora arome ili krajnjih isparljivih komponenata. Pošto je 2,4-dinitrofenilhidrazin nespecifičan reagens i reaguje sa svim karbonilnim jedinjenjima, neophodno je izvršiti korekciju sa uzorkom kod koga je prethodno inaktivirana aliinaza. Ova metoda se ne može koristiti za dehidratirani luk, jer je piruvat nestabilan i tokom čuvanja se prevodi u druga jedinjenja (Brewster i Rabinowich, 1990).

Postupak:

2,5 g očišćenih svežih lukovica usitnjeno je mlevenjem u blenderu u toku 5 min uz dodatak 20 mL vode. Nakon 20 min inkubacije reakcija je zaustavljena dodatkom 5 mL 0,2 g mL⁻¹ trihlorsirćetne kiseline. Dobijena smeša je nakon 1 h filtrirana preko Büchner-ovog levka, a talog ispran vodom. Dobijeni filtrat dopunjen je vodom do 100 mL, a zatim centrifugiran 10 min na 10000 o/min i talog odstranjen (*ekstrakt 1*). Za korekciju su pripremljeni isti ovakvi ekstrakti (*ekstrakt 0*), ali sa lukovicama kod kojih je prethodno inaktivirana aliinaza zagrevanjem u mikrotalasnoj pećnici (2,45 GHz, $\lambda=12$ cm, snaga 300 W) u toku 5 min.

Za radnu probu u epruvetu je pipetirano 0,5 mL *ekstrakta 1*, 1,5 mL dH₂O i 1 mL DNPH reagensa (1,5 g mL⁻¹ rastvor 2,4-dinitrofenilhidrazina u 2 mol dm⁻³ HCl). Za korekciju je umesto *ekstrakta 1*, korišćen *ekstrakt 0* u kome je aliinaza inhibirana. Slepa proba sadržala je 2 mL dH₂O i 1 mL DNPH reagensa. Za konstrukciju kalibracione krive paralelno je analiziran i standardni rastvor pirogroždane kiseline u opsegu koncentracija od 0,01 do 0,14 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ (finalna koncentracija). Sve probe su rađene u tri ponavljanja. Nakon inkubacije od 10 min na temperaturi od 37 °C, u sve probe je dodato po 5 mL 0,6 mol L⁻¹ NaOH, a zatim pipetirano po 300 μL u mikroploče i merena apsorbancija na 445 nm, pomoću Multiscan Spectrum čitača mikroploča (Thermo Corporation). Koncentracija piruvata u svakom ekstraktu očitana je direktno sa kalibracione krive i preračunata na masu lukovice. Rezultati su izraženi u μmol piruvata po g sveže lukovice.

3.9 ISPITIVANJE ANTIOKSIDANTNOG POTENCIJALA EKSTRAKATA

Za procenu antioksidantnog kapaciteta ekstrakata korišćeno je nekoliko testova: testovi kojima se određuje sposobnost neutralizacije slobodnih radikala (DPPH[•], ABTS^{•+}), reaktivnih kiseoničnih vrsta (HO[•]) i reaktivnih oblika azota (NO[•]), i sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije (LP). Sintetski antioksidans butilovani hidroksianizol (BHA) korišćen je kao pozitivna kontrola.

3.9.1 Određivanje ukupnog redukcionog potencijala**Princip**

Ukupna redukciona sposobnost određena je spektrofotometrijskom metodom (Singleton i drugi, 1999), koja se zasniva na sposobnosti Folin-Ciocalteu (FC) reagensa (smeša Na₂WO₄, Na₂MoO₄, HCl, H₃PO₄ i LiSO₄) da reaguje sa redukcionim supstancama iz uzorka – fenolnim jedinjenjima, amino kiselinama, proteinima, tiolima, nekim vitaminima, neorganskim jonima, itd. (Everette i drugi, 2010), pri čemu daje obojeni kompleks čija se apsorbancija meri na 760 nm.

Postupak

Pripremljeni su razblaženi rastvori ekstrakata (po tri koncentracije u intervalu od 0,5–10,0 mg mL⁻¹ za svaki ekstrakt) u 70% metanolu. U mikroploče (12×8) odmereno je po 25 μL rastvora ekstrakta i 125 μL 0,1 mol L⁻¹ FC reagensa. U korekcije je umesto FC reagensa dodato 125 μL dH₂O. Probe su inkubirane tokom 6 min na sobnoj temperaturi, a zatim je u sve probe dodato po 100 μL 75 g L⁻¹ Na₂CO₃. Nakon 2 h inkubacije na sobnoj temperaturi, očitana je apsorbancija na 760 nm pomoću Multiscan Spectrum čitača mikroploča (Thermo Corporation). Paralelno sa uzorcima pripremljeni su i analizirani standardni rastvori galne kiseline u rasponu koncentracija 2,5–200 $\mu\text{g/mL}$. Sve radne probe rađene su u tri ponavljanja, a korekcije u jednom.

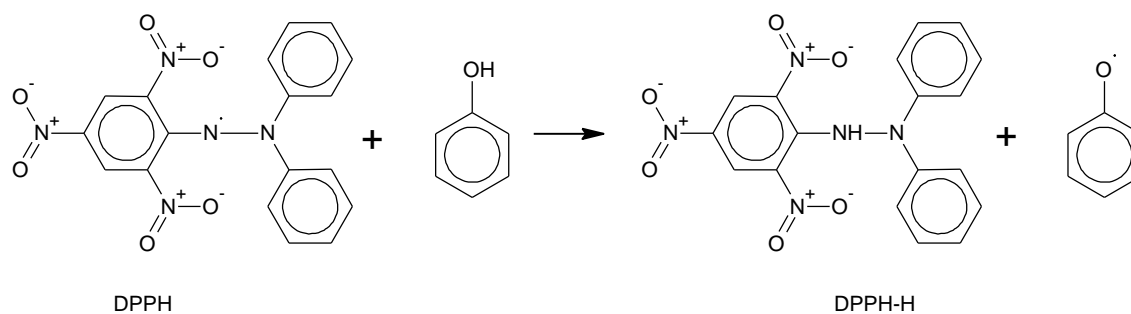
Izračunavanje

Koncentracija ekvivalenta galne kiseline u svakom ekstraktu očitana je direktno sa kalibracione krive i preračunata na masu ekstrakta. Ukupni redukциони potencijal je izražen u mg ekvivalenta galne kiseline po gramu suvog ekstrakta i dat kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija.

3.9.2 Ispitivanje sposobnosti hvatanja DPPH radikala

Princip

Metoda se zasniva na spektrofotometrijskom praćenju konverzije stabilnog, azot-centriranog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH^{*}), intenzivno ljubičaste boje ($\lambda_{\max} = 515 \text{ nm}$), u žuto obojenu redukovanu formu DPPH-H u prisustvu antioksidanasa (Slika 3.5.) (Sánchez-Moreno i drugi, 1998).



Slika 3.5. Reakcija fenola sa DPPH^{*}

Postupak

Pripremljena je serija od osam razblaženja ispitivanih ekstrakata u 70% MeOH u rasponu koncentracija od $0,312 \text{ mg mL}^{-1}$ do 20 mg mL^{-1} . U mikroploči (12×8) pripremljene su radne probe odmeravanjem $190 \mu\text{L}$ MeOH, $10 \mu\text{L}$ rastvora ekstrakta i $100 \mu\text{L}$ rastvora DPPH reagensa ($67,2 \text{ nmol mL}^{-1}$ u MeOH). Kontrola je umesto ekstrakta sadržala $10 \mu\text{L}$ MeOH, a korekcija umesto DPPH reagensa $100 \mu\text{L}$ MeOH. Radne probe i kontrole rađene su u tri, a korekcije u jednom ponavljanju. Nakon 60 min inkubacije na sobnoj temperaturi, očitane su apsorbancije na 515 nm pomoću Multiskan Spectrum čitača mikroploča (Thermo Corporation).

Izračunavanje

Kapacitet hvatanja DPPH radikala (DPPH-RSC) izračunat je prema sledećoj formuli:

$$\text{DPPH-RSC [\%]} = (1 - (A_{\text{proba}} - A_{\text{korekcija}}) / A_{\text{kontrola}}) \times 100$$

gde je:

A_{proba} – srednja vrednost apsorbancije radnih proba za datu koncentraciju

$A_{\text{korekcija}}$ – apsorbancija korekcije za datu koncentraciju

A_{kontrola} – srednja vrednost apsorbancije kontrolnih proba

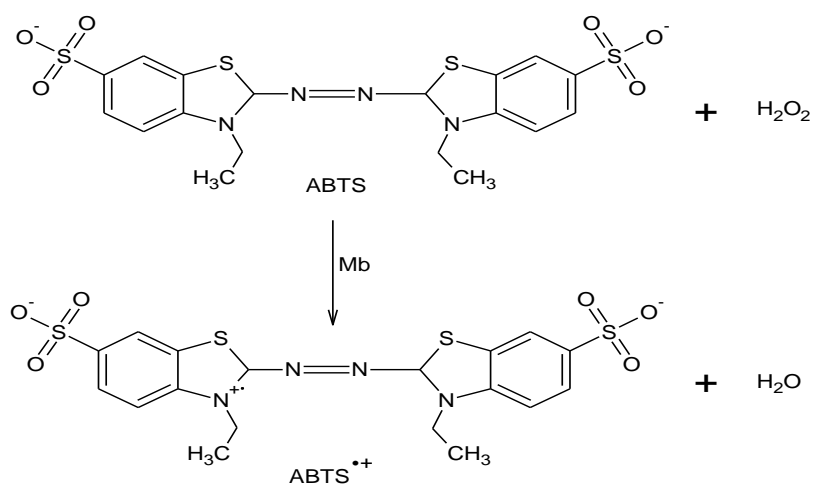
Konstruisane su krive zavisnosti *DPPH-RSC* od radne koncentracije ekstrakta (koncentracija ekstrakta u finalnoj reakcionoj smeši) pomoću *Origin 8.0* softvera (OriginLab, USA), i očitana je IC_{50} vrednost kao koncentracija koja dovodi do neutralizacije 50% *DPPH* radikala. Rezultat je izražen kao srednja vrednost tri određene IC_{50} vrednosti \pm standardna devijacija ($mg\ mL^{-1}$).

3.9.3 Ispitivanje sposobnosti hvatanja $ABTS^{+\bullet}$ (TAS test)

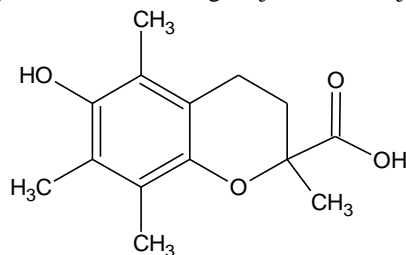
Princip

Za ispitivanje sposobnosti hvatanja $ABTS^{+\bullet}$ korišćen je komercijalni kit Total Antioxidant Status (TAS) (Biorex Diagnostics Ltd, Antrim, UK) standardizovan po metodi Erel-a (2004) i Koračevića i drugih (2001). Princip metode zasniva se na hvatanju radikalskog katjona 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline), $ABTS^{+\bullet}$, od strane antioksidanasa u uzorku. Redukovani ABTS se inkubacijom sa metmioglobinom (koji ispoljava peroksidaznu aktivnost, a nastaje u reakciji između mioglobina i H_2O_2) prevodi u plavo-zeleni radikalski katjon $ABTS^{+\bullet}$ (Slika 3.6.), čija se apsorbanca meri na 660 nm.

Antioksidansi inhibiraju ovu reakciju oksidacije srazmerno njihovoj koncentraciji i onemogućavaju razvijanje boje. Stepem inhibicije se poredi sa stepenom inhibicije za sintetski antioksidans 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilnu kiselinu (Trolox) – vodorastvorni analog α -tokoferola (Slika 3.7.). Granica linearnosti za ovu metodu je 2,5 mmol/L, a osetljivost je 0,01 mmol/L.



Slika 3.6. Nastajanje $ABTS$ radikalskog katjona u reakciji sa metmioglobinom



Slika 3.7. Struktura Trolox-a

Postupak:

Od ekstrakata početne koncentracije $0,2 \text{ g mL}^{-1}$ napravljena su po dva razblaženja u 70% MeOH, u intervalu koncentracija od $0,5$ do 5 mg mL^{-1} , tako da koncentracija Trolox ekvivalentna nije bila veća od $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ (granica linearnosti). U mikroploči (12×8) pripremljene su radne probe odmeravanjem $200 \text{ }\mu\text{L}$ reagensa 1 (test pufer), $30 \text{ }\mu\text{L}$ reagensa 2 (ABTS hromogen) i $10 \text{ }\mu\text{L}$ ekstrakta. Kontrola je umesto ekstrakta sadržala $10 \text{ }\mu\text{L}$ standarda 1 ($0,0 \text{ mmol Trolox ekv. L}^{-1}$), a korekcija je sadržala samo $230 \text{ }\mu\text{L}$ pufera. Paralelno je rađena i proba sa standardom 2 ($1,0 \text{ mmol Trolox ekv. L}^{-1}$). Nakon inkubacije od 5 min na $37 \text{ }^\circ\text{C}$, merena je apsorbancija na 660 nm (Multiskan Spectrum, Thermo Corporation). Sve probe su urađene u tri ponavljanja, a korekcije u jednom.

Apsorbancije za ekstrakt, kontrolu i standard 2 dobijene su oduzimanjem apsorbancije korekcije od apsorbancije odgovarajućih proba.

Totalni antioksidantni status (TAS) je izračunat pomoću jednačine:

$$TAS [\text{mmol Trolox ekviv. L}^{-1}] = (A_k - A_{uz}) / (A_k - A_{Trolox}) \times C_{Trolox}$$

gde je:

A_k – srednja vrednost apsorbancije kontrolnih proba

A_{uz} – srednja vrednost apsorbancije radnih proba za datu koncentraciju ekstrakta

A_{Trolox} – srednja vrednost apsorbancije proba sa standardom 2

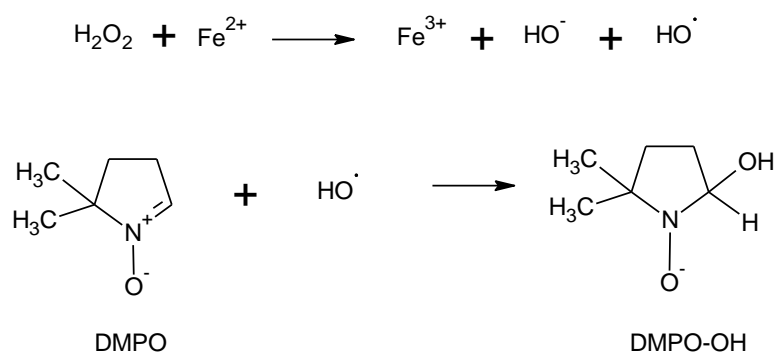
C_{Trolox} – koncentracija Trolox-a = 1 mmol L^{-1}

Dobijene vrednosti za TAS [$\text{mmol Trolox ekviv. L}^{-1}$] podeljene su sa početnom koncentracijom ekstrakta da bi se dobili rezultati izraženi u $\text{mmol Trolox ekviv. g}^{-1}$ suvog ekstrakta. Izračunata je srednja vrednost TAS za dve različite koncentracije ekstrakta.

3.9.4 Određivanje sposobnosti hvatanja hidroksil radikala ESR spektrometrijom

Princip:

Uticaj ekstrakata na formiranje i stabilizaciju hidroksil radikala ($\cdot\text{OH}$) ispitan je primenom elektron spin rezonantne (ESR) spektroskopije po metodi Babović i drugi (2010). S obzirom da su hidroksil radikali visoko reaktivni sa relativno kratkim vremenom polu-života, njihova koncentracija u živim sistemima je obično nedovoljno visoka za direktnu detekciju ESR spektrometrijom. Zbog toga se za detekciju $\cdot\text{OH}$ koristi ESR spin trap tehnika sa 5,5-dimetil-1-pirolin-N-oksid (DMPO) kao spin trap agensom, koji sa $\cdot\text{OH}$ gradi nitroksidne spin adukte (stabilne slobodno-radikalne forme) (Slika 3.8.), čiji spektri se registruju ESR spektroskopijom. Hidroksil radikali se proizvode direktno u reakcionoj smeši u Fentonovoj reakciji (Slika 3.8.).

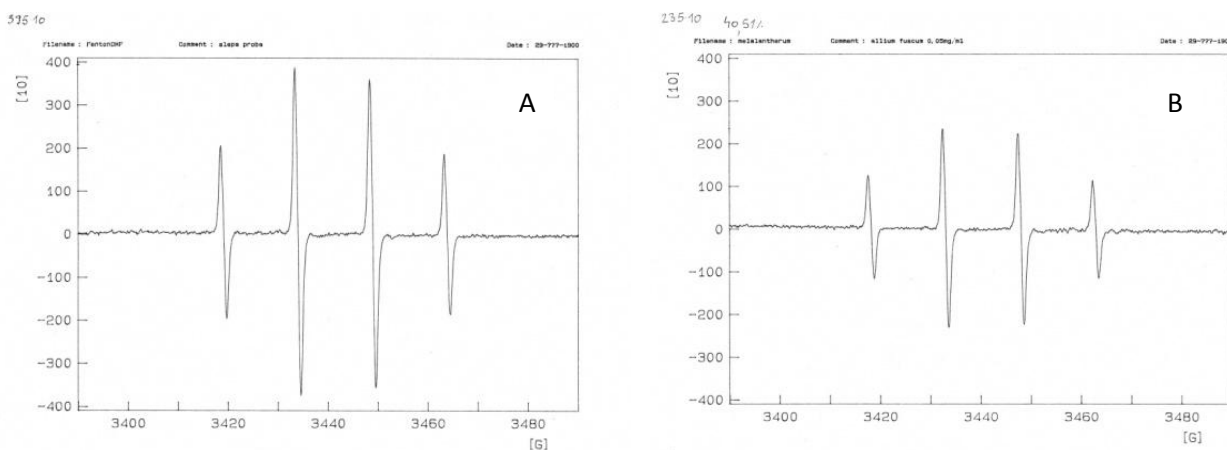


Slika 3.8. Nastajanje hidroksil radikala u Fentonovom sistemu i njegova reakcija sa DMPO

Postupak:

Ispitivani ekstrakti dodavani su u Fentonov reakcioni sistem (0,2 mL 112 mmol dm⁻³ DMPO, 0,2 mL H₂O, 0,2 mL 2 mmol dm⁻³ H₂O₂ i 0,2 mL 0,3 mmol dm⁻³ FeCl₂·4H₂O) u opsegu koncentracija od 0,05–0,5 mg mL⁻¹. U kontrolnu probu umesto ekstrakta dodata je voda. Nakon reakcionog perioda od 2,5 min, snimani su ESR spektri u Bruker ER-160FC kvarcnoj kiveri za vodene rastvore, pomoću Bruker 300E ESR spectrometra (Rheinstetten, Germany), pri sledećim uslovima: frekvencija modulacije 100 kHz, amplituda modulacije 0,226 G, vremenska konstanta 80,72 ms, vremenski opseg merenja 327,68 ms, frekvencija mikrotalasa 9,64 GHz, centar polja 3440 G, ukupan opseg merenja 100 G, snaga mikrotalasnog područja 20 mW, temperatura merenja 23 °C.

Na *Slici 3.9.* prikazani su ESR spektri DMPO-OH radikala bez i sa dodatkom ekstrakta u probu.



Slika 3.9. ESR spektar DMPO-OH kontrole (A) i spektar DMPO-OH nakon dodatka ekstrakta (B)

Sposobnost hvatanja $\cdot\text{OH}$ izračunata je na osnovu podataka dobijenih iz ESR spektara, po formuli:

$$\text{OH-RSC [\%]} = (h_o - h_x) \times 100/h_o$$

gde je: h_o – visina drugog pika ESR signala kontrole

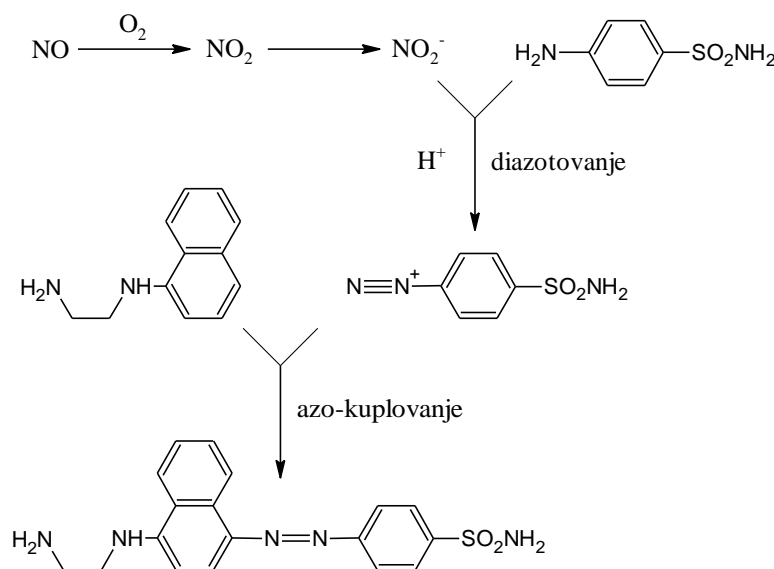
h_x – visina drugog pika ESR signala probe sa ekstraktom

Konstruisane su krive zavisnosti *OH-RSC* od radne koncentracije ekstrakta (koncentracija ekstrakta u finalnoj reakcionoj smeši) pomoću *Origin 8.0* softvera (OriginLab, USA), i očitana je IC_{50} vrednost kao koncentracija koja dovodi do neutralizacije 50% hidroksil radikala (smanjuje visinu drugog pika ESR signala kontrole za 50%).

3.9.5 Određivanje kapaciteta hvatanja NO^{\bullet} radikala

Princip:

Kapacitet hvatanja NO^{\bullet} radikala ispitivanih ekstrakata određen je spektrofotometrijskom metodom (Green i drugi, 1982; Marcocci i drugi, 1994), u kojoj se prati sposobnost ekstrakta da neutrališu generisane NO radikale. Natrijum-nitroprusid (SNP) u vodenom rastvoru pri fiziološkom pH spontano generiše NO radikale, koji reaguju sa kiseonikom dajući nitritne jone. „Hvatači“ NO radikala se takmiče sa kiseonikom za NO što dovodi do smanjenja produkcije nitritnih jona. Nitritni joni na sobnoj temperaturi sa Griess-ovim reagensom (smeša N-(1-naftil)-etilendiamin dihidrohlorida i sulfanilamida u fosfornoj kiselini) daju purpurno-ružičasti diazo kompleks (*Slika 3.10.*), čija se apsorbancija meri na 546 nm.



Slika 3.10. Nastajanje diazo kompleksa u reakciji nitrita sa Griess-ovim reagensom

Postupak:

Pripremljena je serija od osam razblaženja ispitivanih ekstrakata u 70% MeOH u rasponu koncentracija od 16,67 mg mL⁻¹ do 200 mg mL⁻¹. U mračnoj komori (jer je reakcija fotosenzitivna), pripremljene su radne probe u mikroploči (12×8) odmeravanjem 75 μL 10 mmol L⁻¹ natrijum-nitroprusida (SNP) u 0,067 mol L⁻¹ fosfatnom puferu pH 7,4, 15 μL ekstrakta i 65 μL 0,067 mol L⁻¹ fosfatnog pufera pH 7,4. Kontrola je umesto ekstrakta sadržala 15 μL 70% MeOH, a u korekciju je umesto SNP dodat pufer. Radne probe i kontrole rađene su u tri, a korekcije u jednom ponavljanju. Nakon 60 min inkubacije na sobnoj temperaturi i pod konstantnim osvetljenjem, dodato je 150 μL Griess-ovog reagensa, koji je dobijen mešanjem 2 mg mL⁻¹ N-(1-naftil)-etilendiamin dihidrohlorida (NEDA) u dH₂O sa 20 mg mL⁻¹ sulfanilamida u 4% (v/v)

fosfornoj kiselini, *ana partes*, neposredno pre eksperimenta. Absorbancija nastale hromofore merena je na 546 nm pomoću Multiskan Spectrum čitača mikroploča (Thermo Corporation).

Izračunavanje:

Kapacitet hvatanja NO radikala (NO-RSC) računat je prema sledećoj formuli:

$$NO-RSC [\%] = (1 - (A_{proba} - A_{korekcija}) / A_{kontrola}) \times 100$$

gde je:

A_{proba} – srednja vrednost apsorbancije radnih proba za datu koncentraciju

$A_{korekcija}$ – apsorbancija korekcije za datu koncentraciju

$A_{kontrola}$ – srednja vrednost apsorbancije kontrolnih proba

Konstruisane su krive zavisnosti *NO-RSC* od radne koncentracije ekstrakta (koncentracija ekstrakta u finalnoj reakcionoj smeši) pomoću *Origin 8.0* softvera (OriginLab, USA), i očitana je IC_{50} vrednost kao koncentracija koja dovodi do neutralizacije 50% NO radikala. Rezultat je izražen kao srednja vrednost tri određene IC_{50} vrednosti \pm standardna devijacija ($mg\ mL^{-1}$).

3.9.6 Određivanje sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije

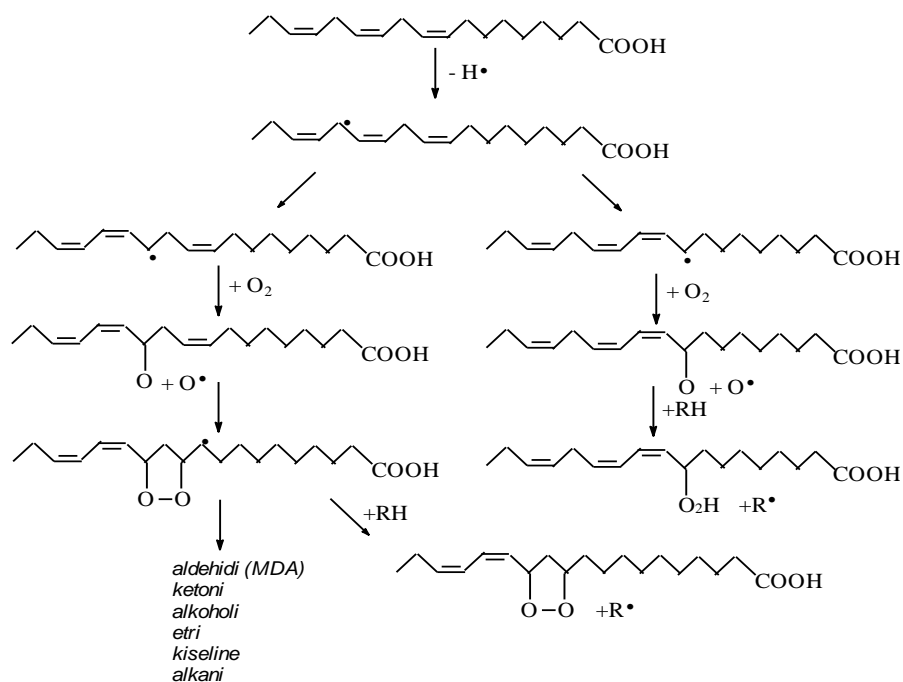
Princip

Uticaj ispitivanih ekstrakata na stepen Fe^{2+} /askorbat indukovane lipidne peroksidacije u lanenom ulju određen je pomoću TBA testa (Aust, 1985), po metodi Orčić i drugi (2011). Metoda se zasniva na merenju intenziteta obojenosti kompleksa (na 532 nm), nastalog reakcijom tiobarbiturne kiseline (TBA) sa malonildialdehidom (MDA), krajnjim proizvodom lančane slobodnoradikalne peroksidacije nezasićenih masnih kiselina (*Slike 3.11. i 3.12.*).

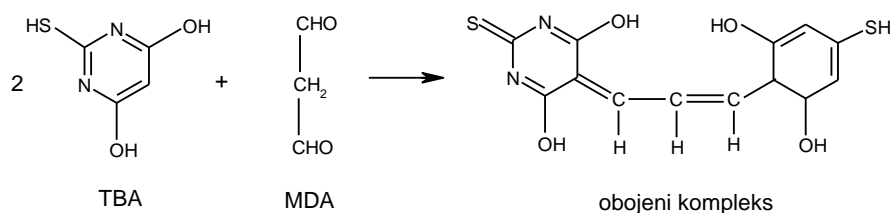
Tačan mehanizam inicijacije lipidne peroksidacije Fe^{2+} jonima nije u potpunosti razjašnjen. Poznato je da Fe^{2+} joni mogu reagovati sa kiseonikom iz vazduha i pri tom generisati reaktivne kiseonične vrste (ROS), kao npr. superoksid anjon ($O_2^{\cdot-}$), za koji se pretpostavlja da je inicijator lančane radikalne reakcije lipidne peroksidacije. Askorbinska kiselina se dodaje u malo koncentraciji da bi održavala jone gvođa u redukovanoj formi (Afanasev i drugi, 1989). Kao izvor nezasićenih masnih kiselina korišćeno je laneno ulje dobijeno iz lanenog semena ekstrakcijom po Soxlet-u. Njegov sastav određen je GC-MS tehnikom i utvrđeno je da sadrži 69,7 % linoleinske i 13,5 % linolne kiseline.

Postupak:

Napravljena je suspenzija mešanjem 35 μL lanenog ulja i 100 mL $0,067\ mol\ L^{-1}$ fosfatnog pufera pH 7,4, u prisustvu 250 μL Tween-80 na ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 1 h. Ova suspenzija (3 mL) pomešana je sa 20 μL $4,58\ mmol\ L^{-1}$ $FeSO_4$, 20 μL $87\ \mu mol\ L^{-1}$ askorbinske kiseline i 20 μL ekstrakta (ili rastvarača u kontroli). Korekcija je sadržala 3 mL pufera i 20 μL ekstrakta. Radne probe i kontrole rađene su u tri, a korekcije u jednom ponavljanju. Nakon inkubacije od 1 h na $37\ ^\circ C$, u sve probe je dodato $0,2\ mL\ 37,2\ mg\ mL^{-1}$ EDTA i 2 mL TBA reagensa ($3,75\ mg\ mL^{-1}$ tiobarbiturne kiseline, 1,3% (v/v) $HClO_4$, $0,15\ g\ mL^{-1}$ trihlorsirćetne kiseline). Reakcione smeše su zagrevane 15 min na $100\ ^\circ C$, ohlađene i centrifugirane na 1600 g tokom 15 min. Iz svake probe je po 300 μL prebačeno u mikroploču (12 \times 8), a zatim je absorbancija merena na 532 nm pomoću Multiskan Spectrum čitača mikroploča (Thermo Corporation).



Slika 3.11. Mehanizam peroksidacije nezasićenih masnih kiselina



Slika 3.12. Reakcija TBA sa MDA, formiranje obojenog adukta

Izračunavanje:

Inhibicija lipidne peroksidacije (I) računata je prema sledećoj formuli:

$$I [\%] = (1 - (A_{\text{proba}} - A_{\text{korekcija}}) / A_{\text{kontrola}}) \times 100$$

gde je:

A_{proba} – srednja vrednost apsorbancije radnih proba za datu koncentraciju

$A_{\text{korekcija}}$ – apsorbancija korekcije za datu koncentraciju

A_{kontrola} – srednja vrednost apsorbancije kontrolnih proba

Konstruisane su krive zavisnosti I od radne koncentracije ekstrakta (koncentracija ekstrakta u finalnoj reakcionoj smeši) pomoću *Origin 8.0* softvera (OriginLab, USA), i očitana je IC_{50} vrednost kao koncentracija koja dovodi do 50% inhibicije LP. Rezultat je izražen kao srednja vrednost tri određene IC_{50} vrednosti \pm standardna devijacija (mg mL^{-1}).

3.10. ISPITIVANJE ANTIINFLAMATORNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA

Princip

Određivanje antiinflamatorne aktivnosti ispitivanih ekstrakata urađeno je po *ex vivo* metodi Beara i drugih (2010), uz određene modifikacije (Lesjak i drugi, 2013). Metoda je zasnovana na određivanju sposobnosti inhibicije produkcije medijatora inflamacije, produkata metabolizma arahidonske kiseline, 12-HHT, TXB₂, PGE₂ i 12-HETE, u intaktnom ćelijskom sistemu (humanim trombocitima), gde je proces inflamacije izazivan dejstvom kalcijumove jonofore A23184 (kalcimicin). Dati metaboliti kvantifikovani su primenom LC-MS-MS tehnike.

Postupak:

Određivanje broja trombocita

Za eksperiment su korišćeni trombociti dobijeni sa Instituta za transfuziju u Novom Sadu, kojima je istekao rok upotrebe (5 dana) za medicinske svrhe, ali koji su i dalje vijabilni. Trombociti su do momenta upotrebe neprestano blago mešani na mućkalici na temperaturi od 20°C do 24°C da bi se sprečilo slepljivanje. Tačan broj trombocita određen je brojanjem u Neubauer-ovoj komori nakon njihovog tretiranja sa amonijum-oksalamatom, pri čemu se pod mikroskopom vijabilni trombociti uočavaju kao svetlucave čestice. Suspenzija trombocita koja se koristi za brojanje napravljena je mešanjem 10 µL koncentrata trombocita i 990 µL 10 mg mL⁻¹ amonijum-oksalata. Nakon 10 min, 10 µL ove suspenzije nanosi se na Neubauer-ovu komoru. Brojanje se vrši pri mikroskopskom uvećanju od 40×, u najmanje četiri kvadrata, za koje se zatim izračuna srednja vrednost broja trombocita po kvadratu. Ovaj broj se zatim podeli sa zapreminom koja staje na jedan kvadrat (4×10^{-6} mL) i pomnoži sa razblaženjem (100) i na taj način dobije se broj trombocita/mL.

Određivanje antiinflamatorne aktivnosti

Napravljena je suspenzija humanih trombocita $2 \cdot 10^8$ ćelija/mL u puferu pH 7,2 (0,137 mol L⁻¹ NaCl, 2,7 mmol L⁻¹ KCl, 2 mmol L⁻¹ KH₂PO₄, 5 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄ i 5 mmol L⁻¹ glukoze). 2 mL ove suspenzije inkubirano je 5 min na 37 °C, nakon čega je dodato 100 µL ekstrakta u DMSO (u rasponu koncentracija 10–300 mg mL⁻¹; u kontrolu dodat DMSO umesto ekstrakta) i 100 µL 125 µmol L⁻¹ rastvora kalcimicina u DMSO (u slepu probu dodat samo DMSO) i inkubacija nastavljena tokom 2 min na 37 °C uz mešanje. Nakon dodatka 300 µL 16,7 mmol L⁻¹ vodenog rastvora CaCl₂ (kod slepe probe – vode), reakciona smeša je ponovo inkubirana tokom 5 min na 37 °C uz mućkanje. Sve probe su rađene u tri ponavljanja. Reakcija je prekinuta dodatkom 5,8 mL hladne 1 % (v/v) HCOOH uz intenzivno mućkanje. Nakon dodatka internog standarda (50 µL rastvora 6 µg mL⁻¹ PGB₂ u DMSO) reakciona smeša je ekstrahovana pomoću 8 mL smeše CHCl₃ : MeOH (1:1) uz intenzivno mućkanje tokom 15 min. Organski sloj je nakon centrifugiranja (15 min, 7012×g, 4 °C) uparen na 40 °C pod sniženim pritiskom, rekonstituisan u 500 µL MeOH i nakon filtracije (membranski filtri od regenerisane celuloze, 25 mm/45 µm, Econofilters, Agilent Technologies) analiziran na LC-MS-MS. Korišćen je Agilent Technologies 1200 Series Rapid Resolution tečni hromatograf sa G6410A QqQ MS-MS detektorom sa elektrosprej (ESI) jonskim izvorom, kontrolisan od strane MassHunter Workstation Data Acquisition softvera, ver. B.01.03 (Agilent Technologies). Injektovano je 5 µL uzorka. Razdvajanje je postignuto na Zorbax SB-C18 30 mm × 2,1 mm × 3,5 µm koloni (Agilent Technologies) temperiranoj na 65 °C, ispred koje je bio vezan *in-line* filter (2 mm, 0,2 µm, Agilent Technologies). Kao mobilna faza A korišćena je 0,6 % v/v sirćetna kiselina, a kao faza B – MeOH. Komponente su eluirane u gradijentnom režimu: 0 min 65 % B, 2 min 100 % B, 3,5 min 100 % B, sa vremenom reekvilibracije od 3 min (ukupno vreme analize 15 min), uz konstantan protok od 1 mL min⁻¹. Celokupna količina eluata prosleđena je u

maseni spektrometar. Parametri jonskog izvora bili su: protok gasa za sušenje (N₂) 9 L min⁻¹, temperatura 350 °C, pritisak gasa za raspršivanje 40 psi, napon na kapilari 4 kV, napon fragmentora 120 V, negativan polaritet. Jedinjenja su praćena u MRM modu, sa vremenskim segmentima:

- 0–0,9 min PGB₂ (jon prekursor $m/z = 333$, kolizijska energija 13 V, jon produkt $m/z = 315$), 12-HHT (prekursor $m/z = 279$, kolizijska energija 5 V, produkt $m/z = 261$), TXB₂ (prekursor $m/z = 369$, kolizijska energija 15 V, produkt $m/z = 169$), PGE₂ (prekursor $m/z = 351$, kolizijska energija 15 V, produkt $m/z = 271$),
- 0,9–3,5 min 12-HETE (prekursor $m/z = 319$, kolizijska energija 7 V, produkt $m/z = 301$).

Izračunavanje

Za svaku koncentraciju ekstrakta izračunat je stepen inhibicije prema formuli:

$$I = 100 \cdot \frac{(R_{kon} - R_{sp}) - (R_{uz} - R_{sp})}{R_{kon} - R_{sp}} = 100 \cdot \frac{R_{kon} - R_{uz}}{R_{kon} - R_{sp}}$$

gde je:

I – stepen inhibicije [%]

R_{kon} – odnos odgovora (*eng.* response ratio) za kontrolu

R_{uz} – odnos odgovora za datu koncentraciju

R_{sp} – odnos odgovora za slepu probu

Odnosi odgovora određeni su kao odnos površine pika datog analita i površine pika internog standarda (PGB₂).

Konstruisane su krive zavisnosti srednje vrednosti inhibicije (I) za tri ponavljanja od radne koncentracije ekstrakta (koncentracija ekstrakta u finalnoj reakcionoj smeši pre dodatka 1 % HCOOH) pomoću *Origin 8.0* softvera (OriginLab, USA), i očitana je IC₅₀ vrednost kao koncentracija koja dovodi do 50% inhibicije sinteze odgovarajućeg metabolita (12-HHT, TXB₂, PGE₂ ili 12-HETE). Rezultat je izražen kao IC₅₀ vrednost ± standardna devijacija ponovljivosti (određena tokom validacije metode).

3.11. ODREĐIVANJE ANTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA

Antibakterijska aktivnost odabranih ekstrakata ispitana je na devet bakterijskih sojeva disk difuzionim testom i dilucionom metodom.

Sojevi bakterija

Za određivanje antibakterijske aktivnosti ekstrakata korišćena su četiri referentnih soja Gram-pozitivnih bakterija: *Sarcina lutea* ATCC 9391, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P i *Bacillus subtilis* ATCC 10707 i četiri referentna soja Gram-negativnih bakterija: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 i tri soja *Esherichia coli* ATCC 25922, SY 252 i IB 112 *lpcA*. *Esherichia coli* IB112 soj ima povišenu permeabilnost zbog *lpcA* mutacije.

Oživljavanje liofiliziranih sojeva i priprema prekonocne kulture

U epruvete je razliveno po 2 mL Luria broth (LB) (10 g triptona, 5 g ekstrakta kvasca, 5 g NaCl rastvoreno u 1 L dH₂O, podešen pH na 7 sa 1 mol L⁻¹ NaOH i sterilisano u autoklavu 20 min

na 121 °C). Špatulom je iz liofiliziranih sojeva zahvatana kultura i uronjena u LB, odakle su kulture zasejane ezom na Lauria agar (LA) (10 g triptonu, 5 g ekstrakta kvasca, 5 g NaCl i 15 g agara rastvoreno u 1 L dH₂O, podešen pH na 7 sa 1 mol L⁻¹ NaOH i sterilisano u autoklavu 20 min na 121 °C) i inkubirane na 37 °C 24 h da bi se dobila prekonocna kultura iz koje se ezom zasejava na LA. Zasejane kulture inkubirane su preko noći na 37 °C da bi se dobile išarane ploče. Sa išaranih ploča ezom je uzeta po jedna kolonija i prenesena u 2 mL LB i promućkana na vorteksu, a zatim je vršena inkubacija na 37 °C u toku 24 h. Ovako su dobijene prekonocne kulture koje su korišćene u disk-difuzionom testu i dilucionoj metodi.

Određivanje broja bakterija u prekonocnim kulturama bakterijskih sojeva

Za određivanje ukupnog broja bakterija u prekonocnoj kulturi korišćena je indirektna metoda koja se zasniva na brojanju kolonija koje su u toku inkubacije nastale od pojedinačnih ćelija. Postupak se sastoji u pravljenju decimalnih razblaženja na sledeći način: u epruvete sa po 5 mL fiziološkog rastvora (0,01 mol dm⁻³ MgSO₄ u dH₂O) dodato je 0,05 mL prekonocne kulture (parna razblaženja) i 4,5 ml fiziološkog rastvora i 0,5 mL prekonocne kulture (neparna razblaženja). Na taj način iz početnog uzorka koji sadrži oko 10⁹ bakterija/mL dobijemo suspenziju u kojoj je koncentracija bakterija oko 10³ ćelija/mL. Iz ovog rastvora pipetirano je 0,1 mL i zasejano na LA. Za svaki bakterijski soj zasejane su po dve Petri ploče. Nakon inkubacije 24 h na 37 °C izbrojane su kolonije i izračunata koncentracija bakterija u prvobitnoj prekonocnoj kulturi (Tabela 3.5.) na osnovu sledeće formule:

$$\text{broj bakterija/mL prekonocne kulture} = B_{sr} \times 10^6 \times 10$$

gde je: B_{sr} – srednja vrednost broja kolonija za dve Petri ploče zasejane istim bakterijskim sojem, 10^6 – faktor razblaženja, 10 – prevođenje sa 0,1 mL na 1 mL

Tabela 3.5. Broj bakterija u prekonocnim kulturama

bakterijski soj	broj kolonija/Petri ploči	srednja vrednost	br. bakterija/mL prekonocne kulture
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9391	$\frac{97}{106}$	102	$1,02 \times 10^9$
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	$\frac{2}{5}$	4	4×10^7
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	$\frac{20}{15}$	18	$1,8 \times 10^8$
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 10707	$\frac{2}{1}$	2	2×10^7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	$\frac{155}{140}$	148	$1,5 \times 10^9$
<i>Esherichia coli</i> ATCC 25922	$\frac{105}{55}$	80	8×10^8
<i>Esherichia coli</i> SY 252	$\frac{124}{170}$	147	$1,5 \times 10^9$
<i>Esherichia coli</i> IB 112 <i>lpcA</i>	$\frac{15}{5}$	10	1×10^8

Disk-difuzioni test

Disk-difuziona metoda (Hindler, 1995) se koristi za preliminarno ispitivanje antibakterijskog efekta biljnih ekstrakata. Prednost korišćenja ove metode ogleda se u maloj količini uzorka koja je potrebna za analizu, kao i mogućnosti testiranja većeg broja uzoraka (3–6) po jednoj Petri ploči. Osnovni nedostatak ove metode je da zavisi od sposobnosti difuzije ispitivane supstance u hranljivu podlogu, pa se supstanca ne raspoređuje homogeno po podlozi, nemoguće je odrediti količinu supstance koja je difundovala, zbog čega je otežano međusobno poređenje antimikrobne aktivnosti različitih ekstrakata (Jorgensen i Turnidge, 2007).

Mueller Hinton agar (MHA) (38 g Mueller Hinton agara rastvoreno je u 1 L dH₂O i sterilisano u autoklavu na 121 °C u toku 20 min) je inokulisan odgovarajućim bakterijskim sojem na taj način što je 0,1 mL prekonocne kulture utrljavano na podlogu. Na svaku ploču postavljeno je po 4 sterilne filter hartije (Whatman paper No.1) kružnog oblika prečnika 12 mm i na svaku hartiju nanoseno 20 µL ekstrakta određene koncentracije. Ekstrakti su pripremljeni uparavanjem osnovnih metanolnih ekstrakata do suva i ponovnim rastvaranjem u dH₂O do koncentracije od 200 mg mL⁻¹, od koga su pravljena odgovarajuća razblaženja. Svaka petri kutija je sadržala 1 vrstu bakterije i 1 ekstrakt u četiri koncentracije (0,25–4 mg po disku). Kao pozitivna kontrola korišćeni su komercijalno proizvedeni diskovi kanamicina (30 µg/disku), penicilina (100 IU/disku), hloramfenikola (70 µg/disku) i cefuroksima (100 µg/disku), dok je za *Pseudomonas aeruginosa*, s obzirom da je bio rezistentan na prethodna četiri antibiotika, urađen test i sa inertnim diskom impregniranim sa rastvorom karbenicillinom (100 µg/disku). Nakon 24 h inkubacije na 37 °C, lenjirom je izmeren prečnik zona inhibicije rasta. Testovi su izvedeni u tri nezavisna eksperimenta i dobijene zone predstavljene su kao srednja vrednosti tri određene zone inhibicije ± standardna devijacija (mm).

Određivanje minimalne baktericidne koncentracije (MBC)

Ekstrakti koji su pokazali antibakterijsku aktivnost u disk-difuzionom testu bili su podvrgnuti određivanju minimalne baktericidne koncentracije dilucionom metodom u epruvetama (Hindler, 1995). Upotrebom dilucione metode određuje se minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) i minimalna baktericidna koncentracija ispitivanih supstanci (MBC). MIC je definisana kao najniža koncentracija ispitivanih supstanci pri kojoj (vizuelno) ne dolazi do rasta bakterija, ali dolazi do porasta na hranljivom medijumu. MBC je ona koncentracija pri kojoj je 99,9% od početnog broja bakterijskih ćelija ubijeno, tj. ne dolazi do rasta ni na hranljivom medijumu. Pripremljena je serija dvostrukih razblaženja ekstrakata. U epruvete je sipano po 1 mL Mueller Hinton broth (21 g Mueller Hinton broth rastvoreno u 1 L dH₂O i sterilisano u autoklavu 20 min na 121 °C), 200 µL ekstrakta određene koncentracije (200, 100, 50 i 25 mg mL⁻¹) i 0,1 mL prekonocne bakterijske kulture (*Staphylococcus aureus*, 2 × 10⁸ bakterija /mL). Kontrola rasta sadržala je medijum sa bakterijskom suspenzijom, a kontrola sterilnosti samo medijum. Sve probe su rađene u tri ponavljanja. Nakon 24 h inkubacije na 37 °C, minimalna baktericidna koncentracija (MBC), tj. najniža koncentracija ekstrakta na kojoj nema rasta bakterija, određena je vizuelno na osnovu odsustva zamućenosti. Za proveru tačnosti određenog MBC-a, iz epruvete sa najnižom koncentracijom ekstrakta u kojoj nema zamućenosti zasejane su kulture na LA. Ukoliko nakon inkubacije od 24 h na 37 °C nije bilo rasta bakterija, potvrđen je pretpostavljeni MBC (Mahon i Munuselis, 1995).

3.12 ODREĐIVANJE ANTIVIRALNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA

Princip: Antiviralna aktivnost odabranih ekstrakata ispitana je metodom inaktivacije, koja omogućava određivanje koncentracije antiviralnog agensa koja redukuje brojnost viriona na polovinu (PhI_{50}) (Knezevic i drugi, 2011).

Postupak:

Korišćena su dva *Pseudomonas aeruginosa* specifična bakteriofaga – δ (familija *Podoviridae*) i σ -1 (familija *Siphoviridae*). Kao originalni domaćin faga δ korišćen je soj *P. aeruginosa* PA-4U, a kao domaćin faga σ -1 referentni soj ATCC 9027. Fagi su umnoženi na odgovarajućem domaćinu, precipitirani pomoću NaCl (58,4 g L⁻¹) i PEG6000 (1:10 w/v), istaloženi centrifugiranjem (11000 g 10 min na 4 °C) i prečišćeni izopikničkim ultracentrifugiranjem u diskontinuiranom gradijentu CsCl (1,45; 1,50 i 1,70 g mL⁻¹; 151000 g u toku 1 h na 4 °C) (Sambrook i Russell, 2001). Nakon dijalize, suspenzije faga u SM puferu (50 mM Tris HCl [pH 7,5]; 0,1 M NaCl; 8 mM MgSO₄; 1 mg mL⁻¹ želatina) čuvane su na 4 °C, a bakterijski sojevi na -70 °C, u podlozi sa 10% glicerola. Bakterije su za potrebe eksperimenta gajene na tačnoj Luria-Bertani podlozi na 37 °C u toku 24 časa.

Bakteriofagi, čija je brojnost u finalnoj zapremini iznosila 1×10^6 PFU mL⁻¹, pomešani su sa odabranim ekstraktima čija se finalna koncentracija kretala od 1,25 mg mL⁻¹ do 40 mg mL⁻¹. Pored toga, ispitana je i antiviralna aktivnost standarda cimetine kiseline i kvercetina, rastvorenih u metanolu i DMSO-u, a čije su koncentracije odabrane nakon preliminarnih eksperimenata i kretale su se od 0,0625 mg mL⁻¹ do 2 mg mL⁻¹ (0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1 i 2 mg mL⁻¹). Kontrola je podrazumevala inkubaciju bakteriofaga sa najvišom koncentracijom rastvarača, bez dodatka ekstrakta ili ispitivane supstance. Pripremljene smeše faga i ekstrakata inkubirane su na 37 °C u toku 30 min, nakon čega je efekat ekstrakata neutralisan desetostepenim razređivanjem tretiranih bakteriofaga u SM puferu. Kontrola je tretirana na identičan način. Nakon tretmana određivan je titar faga metodom plaka (Carlson, 2005), a brojnost vijabilnih faga u odnosu na kontrolu izražen je u procentima. Sve analize rađene su u triplikatu i u tri nezavisna eksperimenta.

3.13 ODREĐIVANJE ANTIMUTAGENE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA

Princip:

Antimutagena aktivnost ekstrakata određena je merenjem njihovog protektivnog delovanja na oksidativna oštećenja DNK i mutagenezu u bakterijama. Za testiranje je korišćen reverzno-mutacijski test na *Esherichia coli* WP2. Kao test organizam korišćen je soj IC202 *trpE65 oxyR/pKM101*. Ovaj soj je *oxyR* mutant, pa je izrazito osetljiv na oksidativni stres. IC202 sadrži i plazmid pKM101 koji nosi *mucAB* gen visoko osetljiv na delovanje oksidacionih mutagena, i ima mutaciju na genu *trpE65*, zbog čega ne može da sintetiše triptofan. *tert*-butil-hidroperoksid (*t*-BOOH), kao jak oksidacioni mutagen, aktivira *mucAB* gen, koji zatim pokreće reparacionu mutagenezu, mutacija na *trpE65* biva ispravljena, što dovodi do formiranja Trp⁺ revertanata (Martinez i drugi, 2001). Broj Tpr⁺ revertanata proporcionalan je jačini oksidacionog mutagena, a obrnuto proporcionalan jačini antimutagenog agensa.

Postupak:

U prvom delu eksperimenta određena je maksimalna koncentracija ekstrakta koja ne deluje toksično na ispitivani test organizam (*E. coli* IC202). Toksičnost je ispitivana na LA i na ET4 podlogama. Prekonoćna bakterijska kultura, koja je korišćena u ovom testu dobijena je tako što je u 10 mL LB dodato 25 μL 8 mg mL^{-1} ampicilina i 500 μL odmrznute kulture soja *E. coli* IC202 (0,42 mL 87% sterilnog glicerola i 0,58 mL prekonoćne kulture, čuvano na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), a zatim ova smeša inkubirana na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 24 h. U 3 mL otopljenog ($45\text{ }^{\circ}\text{C}$) top agara (6 g L^{-1} agara i 5 g L^{-1} NaCl u destilovanoj vodi), dodato je 0,1 ml 10^{-5} prekonoćne kulture i 10 μL ekstrakta (u rasponu koncentracija $10\text{--}150\text{ mg mL}^{-1}$), a zatim je smeša razlivena na LA. Paralelno je rađena i kontrola rastvarača (MeOH). Nakon inkubacije od 24 h na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, određen je ukupan broj bakterija. Postupak ispitivanja toksičnosti na minimalnoj ET4 podlozi (15 g agara rastvoreno u 1 L dH_2O , sterilisano u autoklavu 20 min na $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, a zatim dodato 20 mL Vogel Bonner medijuma E (50 \times) ($2,87\text{ mol L}^{-1}$ K_2HPO_4 , 40 mmol L^{-1} $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,84\text{ mol L}^{-1}$ $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 476 mmol L^{-1} monohidrat limunske kiseline, autoklavirano), 10 mL 40% D-glukoze i 0,5 mg triptofana) bio je isti kao i na LA, s tom razlikom što prekonoćna kultura nije bila razblažena, a inkubacija je trajala 48 h. Broj preživelih ćelija poređen je sa kontrolom (podloga bez ekstrakta). Isti broj izraslih kolonija ukazivao je na nepostojanje toksičnog efekta ekstrakata. Eksperimenti određivanja antimutagenog efekta rađeni su u okviru netoksičnih koncentracija.

Drugi deo eksperimenta obuhvatao je određivanje antimutagenog efekta na spontanu i *t*-BOOH indukovanu mutagenezu. U 3 ml otopljenog top agara ($45\text{ }^{\circ}\text{C}$) dodato je po 0,1 mL sveže prekonoćne kulture bakterijskog soja *E. coli* IC202 i 10 μL ekstrakta tako da njegova finalna koncentracija bude: 0,1; 0,5; 1 i 4 mg suvog ekstrakta po petri-ploči. Ovako pripremljena smeša razlivena je na minimalnu ET4 podlogu. Za određivanje indukovane mutageneze, pored prekonoćne kulture i testirane supstance, dodat je i vodeni rastvor mutagena *t*-BOOH tako da je njegova finalna koncentracija bila 25 μg po petri-kutiji. Nakon inkubacije od 48 h na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ određivan broj Trp^+ revertanata. Paralelno je praćena i kontrola rasta ispitivanog bakterijskog soja (bez dodatka ekstrakta), kao i kontrola rastvarača (MeOH).

Antimutageni efekat je izražen kao procenat inhibicije mutageneze (I) (Ong i drugi, 1985) i računat prema formuli:

$$I [\%] = (1 - N_u / N_k) \times 100$$

gde je : N_u – broj indukovanih revertanata po petri kutiji sa ekstraktom, a N_k – broj indukovanih revertanata po petri kutiji sa rastvaračem.

Za procenu antimutagenog potencijala korišćena je kategorizacija predložena od strane Wall-a i drugih (1988). Prema navedenoj kategorizaciji ako se procenat inhibicije mutageneze kreće u intervalu od 0–20%, supstanca nema antimutageni efekat, od 20–40% – ima slab antimutageni efekat, od 40–60% – ima antimutageni potencijal, od 60–80% – ima jak antimutageni potencijal, i $> 80\%$ – sumnja u toksični efekat.

3.14 ISPITIVANJE GENOTOKSIČNOG EFEKTA EKSTRAKATA

Princip:

Genotoksičnost ispitivanih ekstrakata određena je primenom alkalnog komet testa, nazvanog još i test elektroforeze pojedinačnih ćelija (SCGE – single cell gel electrophoresis), koji su razvili Ostling i Johanson 1984. godine, a modifikovali Singh i drugi (1988). Nakon izlaganja ćelija

genotoksičnom agensu, ćelije se stavljaju u agarozni gel na mikroskopskim pločicama, liziraju u alkalnim uslovima (pH 10) da bi se uklonili ćelijski proteini, a zatim izlažu još jačim alkalnim uslovima (pH 13) da bi se DNK denaturisala i izvela elektroforeza. Za vreme elektroforeze, neoštećeni spiralizovani molekuli DNK migriraju sporo i pod mikroskopom imaju sferan oblik. Nasuprot tome, prekinuti i odvijeni delovi DNK imaju negativan naboj, pa se u električnom polju kreću brže prema anodi u odnosu na neoštećene delove, zbog čega pod mikroskopom imaju oblik komete. Oštećenja DNK se kvantifikuju uz pomoć kompjuterske analize i izražavaju kao % DNK u repu komete.

Postupak:

Pripremanje ćelijske suspenzije

Ispitivanje je vršeno na monoslojnim ćelijskim kulturama humanih plućnih fibroplasta (Human fetal lung fibroblast cells – MRC-5; ECACC No. 84101801) i humanih ćelija karcinoma debelog creva (HT-29 – Human colon adenocarcinoma grade II cell line; ECACC No. 91072201). 70% metanolni ekstrakti upareni su do suva i rastvoreni u DMSO, a zatim su ovi osnovni rastvori razblaženi sterilnom destilovanom vodom do koncentracije od 2 mg mL⁻¹. Ovako razblaženi ekstrakt korišćen je u daljem eksperimentu. Ćelije su odmrznute, prebačene u medijum za rast (DMEM sa dodatkom 150 µL mL⁻¹ FBS, 100 µg mL⁻¹ streptomocina i 100 IU mL⁻¹ penicilina) u flaskove od 75 cm² (Corning, New York, USA) i odgajene stajanjem na 37 °C u CO₂ inkubatoru u toku 72 h. Odvojen je medijum, ćelije isprane sa 1×PBS (PBS (10×) razblažen sterilnom destilovanom vodom u odnosu 1:10), dodato 600 µL 1 mg mL⁻¹ tripsina i ostavljeno 5 min na 37 °C (da bi se ćelije odvojile od podloge). Dodato je 5 mL medijuma, sve prebačeno u sterilnu epruvetu i centrifugirano 10 min na 1500 rpm. Medijum je pažljivo odvojen i ćelije suspendovane u 2 mL medijuma. Uzeto je 10 µL ćelijske suspenzije i dodato 40 µL 0,5 % tripan plavog da bi se ćelije obojile, a zatim su one izbrojane na hemocitometru i izračunat je broj ćelija po mililitru. U svaki bunar ploče za gajenje ćelija (12-well, Thermo Scientific Nunc, Germany) dodato je po 1 mL medijuma i 40000 MRC-5 ćelija, odnosno 30000 HT-29 ćelija po bunaru. Nakon formiranja konfluentnog monosloja (inkubacija 3 h na 37 °C u atmosferi 5 % CO₂, 100 % vlažnosti) medijum je izvađen i zamenjen istom zapreminom medijuma u kome se nalazio ispitivani ekstrakt u koncentraciji pri kojoj je preživljavanje ćelija veće od 80 %. Smeša je ponovo inkubirana 20 h pod istim uslovima. Negativna i pozitivna kontrola su takođe uključene u analizu, kao i kontrola rastvarača. U negativnoj kontroli nalazio se medijum bez ekstrakta, a kontrola rastvarača je umesto ekstrakta sadržala istu zapreminu rastvarača. U pozitivnoj kontroli koja je inkubirana sa medijumom zajedno sa ostalim probama, 20 min pre isteka 20 h inkubacije medijum je zamenjen sa medijumom koji je sadržao 0,5 mmol L⁻¹ genotoksičnog agensa – *tert*-butil hidroperoksida (*t*-BOOH), i proba je inkubirana 20 min na 4 °C. Nakon inkubacije, medijum je u svim probama izvađen, ćelije isprane sa 500 µL 1×PBS, a zatim tripsinizovane (dodato 600 µL 1 mg mL⁻¹ tripsina i ostavljeno 5 min na 37 °C) da bi se odlepile od podloge. Dodato je po 1 mL medijuma i dobijena suspenzija centrifugirana u ependorfu 10 min na 100×g, a pelet je resuspendovan u 2 × 30 µL 1×PBS. Tako su dobijeni parovi koji su korišćeni za alkalni komet test.

Priprema mikroskopskih pločica i fiksiranje ćelija na gel

Mikroskopske pločice sa jednim peskiranim krajem potapane su u apsolutni metanol, a zatim spaljivane na plamenu da bi se odstranio alkohol. Suva stakla uronjena su u 10 mg mL⁻¹ NMP agarozu (u destilovanoj vodi), obrisana sa jedne strane i ostavljena preko noći da se osuše. Na njih je na dva mesta nanošeno po 80 µL rastopljene 10 mg mL⁻¹ NMP agaroze (u 1×PBS), pokrivano pokrovnim staklom i ostavljeno 5 min na 4 °C da se stegne. Zatim je pažljivo skinuto pokrovno staklo. 30 µL ćelijske suspenzije (oko 3×10⁵ ćelija/mL) pomešano je sa 70 µL 10 mg mL⁻¹ LMP

agaroze (u $1 \times \text{PBS}$), koja je prethodno zagrejana na oko $37\text{ }^\circ\text{C}$, i izliveno na sloj NMP. Ponovo je ovaj sloj pokriven pokrovnim staklom i ostavljen 5 minuta na $4\text{ }^\circ\text{C}$, posle čega je pažljivo uklonjeno pokrovno staklo. Na ovaj način ćelije su fiksirane u gelovima i spremne za liziranje.

Liziranje ćelija

Liziranje ćelija je vršeno potapanjem pločica sa gelom u rastvor za liziranje pH 10 ($2.5\text{ mol L}^{-1}\text{ NaCl}$, $100\text{ mmol L}^{-1}\text{ EDTA}$, $10\text{ mmol L}^{-1}\text{ TRIS}$, precizno podešen pH na 10 sa $10\text{ mol L}^{-1}\text{ NaOH}$; neposredno pre upotrebe dodat Triton X-100 do 10 mg mL^{-1} i rastvor snažno promućkan) i inkubacijom na $4\text{ }^\circ\text{C}$ u toku 1h u mraku. Ovakav tretman visokim koncentracijama soli dovodi do uklanjanja membrana, citoplazme, nukleoplazme i narušava nukleozome, jer skoro svi histoni – bazni proteini male molekulske mase koji učestvuju u izgradnji hromatina, odnosno hromozoma – bivaju rastvoreni solima. Ono što ostaje je nukleoid, koji se sastoji od nuklearnog matriksa i DNA.

Denaturacija DNA

U sledećoj fazi eksperimenta vršena je denaturacija i rasplitanje DNA lanaca. Pločice su izvađene iz rastvora za liziranje, osušene a zatim uronjene u rastvor za denaturaciju pH 13 ($0,3\text{ mol L}^{-1}\text{ NaOH}$ i $1\text{ mmol L}^{-1}\text{ EDTA}$ u destilovanoj vodi) i inkubirane na $4\text{ }^\circ\text{C}$ u toku 20 min u mraku. Pri pH 13 dolazi do raskidanja vodoničnih veza između lanaca DNK.

Elektroforeza DNA

Nakon denaturacije vršena je elektroforeza u istom puferu kao za denaturaciju 20 min na $4\text{ }^\circ\text{C}$ u mraku pri naponu od 25 V ($0.7\text{--}1\text{ V cm}^{-1}$) i jačini struje od 300 mA . Posle završene elektroforeze pločice su izvađene i osušene ubrusom, a zatim potopljene u pufer za neutralizaciju ($0,4\text{ mol L}^{-1}\text{ TRIS}$, pH 7,5 podešen sa cc HCl) i ostavljene 15 min.

Rastvori za liziranje, denaturaciju, elektroforezu i neutralizaciju pripremani su neposredno pred eksperiment i do upotrebe čuvani na $4\text{ }^\circ\text{C}$.

Bojenje

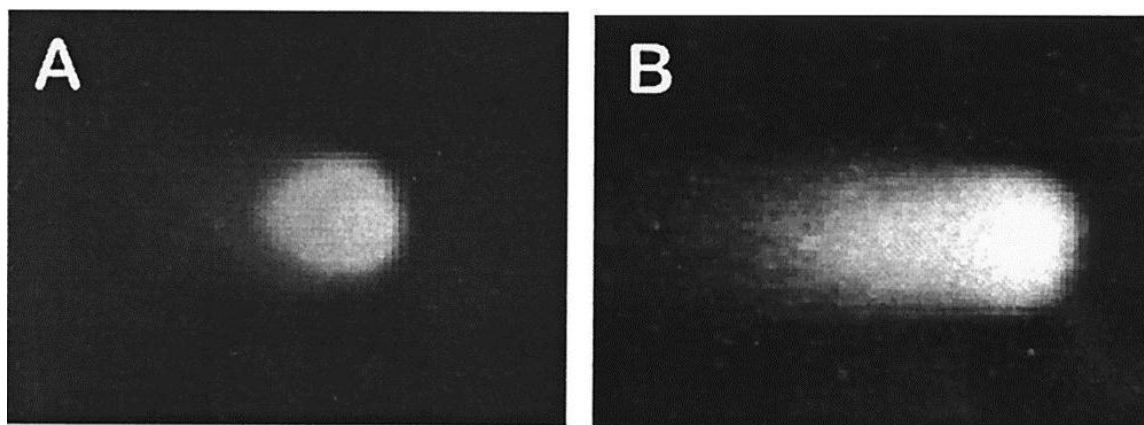
Gelovi su obojeni fluorescentnom bojom koja interkalira u DNA. Na svaki gel naneto je po $20\text{ }\mu\text{L}$ etidijum bromida ($5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ u dH_2O) i pokriveno pokrovnim staklom.

Vizuelizacija kometa

Za svaki uzorak analizirano je 50 nasumično odabranih nukleusa (25 po svakom gelu sa jedne pločice). Komete su vizuelizovane pomoću fluorescentnog mikroskopa Leica DMLS (Leica Microsystems GmbH, Austria) sa ekscitacionim filterom od 510 nm do 560 nm , barijernim filterom od 590 nm i uvećanjem od $400\times$ (Slika 3.14.), koji je snabdeven digitalnom kamerom F-046B IRF (Marlin, UK).

Kvantifikacija DNA oštećenja

DNA oštećenja su kvantifikovana kompjuterskom analizom (Image analysis software, Comet Assay IV Image Analysis system, Perceptive Instruments, UK). Step en oštećenja DNA izražen je kao procenat DNA u repu komete (dobijem kao odnos sume intenziteta piksela u repu komete i sume intenziteta piksela u repu i glavi komete), koji je najčešće preporučivani parametar za izražavanje stepena oštećenja DNA u komet testu.



Slika 3.14. Izgled neostećenog (A) i oštećenog nukleusa (B) pod fluorescentnim mikroskopom

Statistička obrada

Za statističku obradu dobijenih rezultata korišćen je program SigmaStat 3.1 (Systat Software GmbH, Germany). Razlike između tretmanâ ćelija u okviru jednog eksperimenta analizirane su jednosmernom analizom varijanse (one-way analysis of variance, non-parametric ANOVA, Kruskal–Wallis test), sa intervalom poverenja od 95% ($p < 0,05$).

3.15 ODREĐIVANJE ANTITUMORSKE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA

Gajenje ćelijskih kultura

Za određivanje uticaja ekstrakata na rast ćelija korišćene su humane tumorske ćelijske linije HeLa (epitelni karcinom cerviksa), MCF7 (adenokarcinom dojke), HT-29 (adenokarcinom debelog creva), kao i linija humanih zdravih ćelija MRC-5 (fetalni fibroblasti pluća) (Tabela 3.6.). Sve četiri ćelijske linije su adherentne (pokazuju afinitet vezivanja za podlogu). Ćelije su kultivisane u DMEM medijumu sa dodatkom $100 \mu\text{L mL}^{-1}$ FBS, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ streptomicina i 100 IU mL^{-1} penicilina, u flaskovima od 25 cm^2 u (Corning, New York, USA) na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ u atmosferi od 95 % vazduha i 5 % CO_2 pri visokoj relativnoj vlažnosti. Ćelije su subkultivisane dva puta nedeljno upotrebom 1 mg mL^{-1} tripsina sa 0.4 mg mL^{-1} EDTA i tretirane u logaritamskoj fazi rasta.

Tabela 3.6. Osnovne karakteristike izabranih ćelijskih linija

ćelijska linija	kataloški broj	organ	histološki tip/obolenje	vreme udvajanja [h]*
HeLa	ECACC** 93021013	cerviks	epitelne/karcinom cerviksa	21
MCF7	ECACC 86012803	dojka	epitelne/adenokarcinom dojke	35
HT-29	ECACC 91072201	kolon	epitelne/adenokarcinom debelog creva	39
MRC-5	ECACC 84101801	pluća	fetalni fibroblasti/zdravo tkivo	27

* Vreme potrebno da se broj ćelija udvostruči

** European Collection of Cell Cultures

Priprema uzoraka

Za ispitivanje su korišćeni metanolni ekstrakti, upareni do suva i rastvoreni u DMSO do koncentracije od 300 mg mL^{-1} (detaljna priprema ekstrakata opisana je u poglavlju 3.3.1). Standardi kvercetin, rutin, ferulna i cimetna kiselina rastvoreni su u DMSO. Lekovi Doxorubicin®

i Gemzar® rastvoreni su u 9 mg mL⁻¹ NaCl. Svi ekstrakti, standardi i lekovi razblaženi su sa 9 mg mL⁻¹ NaCl do željenih koncentracija i sterilisani filtracijom kroz 0,22 µm membranske mikrofiltere (Sartorius, Germany).

3.15.1 Ispitivanje antiproliferativne aktivnosti ekstrakata

Princip:

Ćelije su inkubirane u prisustvu ekstrakata, standardnih jedinjenja ili lekova. Intenzitet ćelijskog rasta određen je merenjem ukupne količine proteina kolorimetrijskim sulforhodamin B (SRB) testom (Skehan i drugi, 1990). Sulforhodamin B je fluorescentna anjonska boja koja se u blago kiseloj sredini elektrostatički vezuje za pozitivno naelektrisane aminokiselinske ostatke ćelijskih proteina dajući izrazito stabilne konjugate koji fluoresciraju jarko crveno. Nakon vezivanja proteina i ispiranja viška boje, dodatkom slabe baze (TRIS), SRB se kvantitativno ekstrahuje iz ćelije i izmeri absorbancija na specifičnoj talasnoj dužini (540 nm) na osnovu čega se određuje ćelijski rast.

Postupak:

Suspenzije ćelija, gustine 3–5×10³ ćelija po otvoru, dodate su u 180 µL DMEM medijuma sa 50 mg mL⁻¹ FBS u mikrotitar ploče sa 96 otvora (Sarstedt, Newton, USA) i preinkubirane 24 h na 37 °C. U svaki otvor dodato je po 20 µL ekstrakta (serija duplih razblaženja) do postizanja željene finalne koncentracije (0,0039 - 1 mg mL⁻¹). Uporedo sa ekstraktima ispitivani su i komercijalni lekovi koji se koriste u hemoterapiji kancera Gemzar® i Doxorubicin® u rasponu koncentracija 0,003-31,3 µg mL⁻¹ i 0,006-58,1 µg mL⁻¹, respektivno. Takođe, ispitivan je i poznati antioksidans vitamin C, kao i standardi fenolnih jedinjenja (kvercetin, rutin i ferulna kiselina), pri čemu je 1 µL standarda u DMSO (serija duplih razblaženja) dodavan u 199 µL medijuma DMEM sa 50 mg mL⁻¹ FBS, kako bi se postigla željena finalna koncentracija (0,002-0,5 mg/ml). U kontrole je umesto uzorka dodavana ekvivalentna zapremina rastvarača. Koncentracija DMSO u ćelijskoj kulturi bila je ≤ 5 µL mL⁻¹. Posle dodavanja uzoraka, probe su inkubirane 48 h na 37 °C, što je adekvatno vremenu od 2–3 generacije ćelija u kontroli (*Tabela 3.6.*). Nakon inkubacije, ćelije su fiksirane sa 0,5 g mL⁻¹ TCA u toku 1 h na 4 °C, isprane destilovanom vodom (Wellwash 4, LabSystems; Helsinki, Finland) i obojene sa 4 mg mL⁻¹ SRB u 10 mL L⁻¹ sirćetnoj kiselini (75 µL po otvoru) u toku 30 min na sobnoj temperaturi. Ploče su zatim isprane 4 puta sa 10 mL L⁻¹ sirćetnom kiselinom (200 µL po otvoru) da bi se uklonio višak boje. SRB je ekstrahovan iz ćelije dodatkom 10 mmol L⁻¹ tris[hidroksimetil]aminometanom (TRIS) (200 µL po otvoru). Absorbanca dobijenog rastvora merena je na 540 nm (specifična talasna dužina za SRB) i 620 nm (referentna talasna dužina za uklanjanje apsorbance pozadine) pomoću fotometra (Multiscan Ascent, LabSystems; Helsinki, Finland). Efekat na ćelijski rast izražen je kao procenat od kontrole i računat prema formuli:

$$K [\%] = (A_u/A_k) \times 100$$

gde je: K – procenat od kontrole, A_u – absorbanca uzorka, A_k – absorbanca kontrole.

Absorbanca je dobijena oduzimanjem absorbance na 690 nm od absorbance na 540 nm ($A = A_{540 \text{ nm}} - A_{690 \text{ nm}}$). Svi tretmani ispitani su u osam ponavljanja.

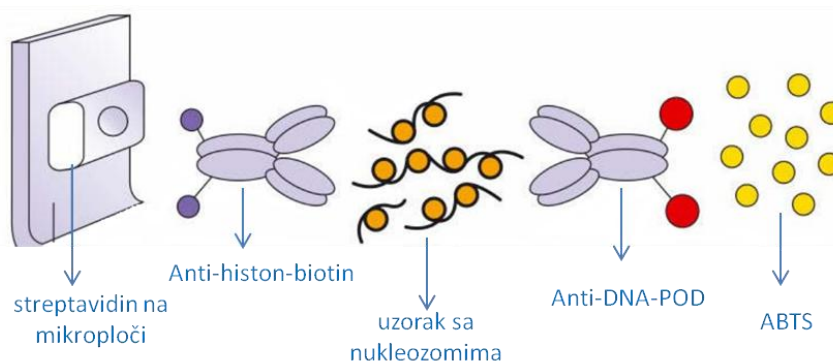
Antiproliferativna aktivnost ekstrakta izražena je kao IC₅₀ vrednost (koncentracija ekstrakta/standarda pri kojoj je inhibicija ćelijskog rasta 50 %). Ova vrednost očitana je iz krivih zavisnosti ćelijskog rasta od finalne koncentracije ekstrakta/standarda dobijenih polinomskom regresionom analizom (software ORIGIN 8.0, OriginLab, USA). Ne-tumor/tumor odnos (NT/T) računat je za ekstrakte, standarde i lekove korišćenjem IC₅₀ vrednosti dobijenih za ne-tumorsku i

tumorske ćelijske linije, a vrednosti NT/T iznad 1 odgovaraju većoj inhibiciji rasta tumorske ćelijske linije u odnosu na zdravu.

3.15.2 Ispitivanje mehanizma ćelijske smrti

Princip:

Apoptoza i nekroza detektovane su korišćenjem Cell Death Detection ELISA^{PLUS} kita (Version 11.0, Roche). Ovaj spektrofotometrijski test se koristi za specifično *in vitro* kvalitativno i kvantitativno određivanje mono- i oligonukleozoma (DNA fragmenata vezanih za histone) u citoplazmatskoj frakciji pre i posle liziranja ćelija. Zasnovan je na enzimskoj sendvič-imunoadsorbcionoj metodi, u kojoj se koriste monoklonalna antitela miša – anti-DNA i anti-histon, koja vezuju DNA i histone, respektivno. Za anti-histon antitelo vezan je biotin koji može da reaguje sa streptavidinom, proteinom koji ima izrazito visok afinitet za biotin, a kojim su obložene mikroploče. Anti-DNA antitelo sadrži enzim peroksidazu (POD), koja katalizuje oksidaciju 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonata) (ABTS radikala) i prevodi ga u zeleni ABTS⁺ (Slika 3.13.), čiji je apsorbcioni maksimum na 405 nm. Tokom perioda inkubacije, anti-histon antitelo vezuje se za histonsku komponentu nukleozoma i simultano gradi imunokompleks sa streptavidinom putem biotinizacije. Pored toga, anti-DNA-POD antitelo reaguje sa DNA komponentom nukleozoma. Količina nukleozoma ekvivalentna je količini peroksidaze iz imunokompleksa, a ona se određuje spektrofotometrijski bojenom reakcijom sa ABTS supstratom (Slika 3.13.). Korišćena anti-histon antitela miša vezuju se za histone H1, H2A, H2B, H3 i H4 različitih organizama, dok anti-DNA-POD antitelo reaguje i sa jednostrukim i sa dvostrukim lancem DNA.



Slika 3.13. Komponente reakcione smeše u metodi određivanja mehanizma ćelijske smrti

Postupak:

Detekcija tipa ćelijske smrti rađena je po metodi Četojević-Simin i drugi (2015) za ekstrakte koji su u eksperimentima uticaja na ćelijski rast ispunili kriterijum $IC_{50} < 100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Korišćena je osam puta veća koncentracija ekstrakta od one koja za 48 h inhibira ćelijski rast za 50% ($c = 8 \times IC_{50}$), kako bi se vreme inkubacije, tokom kojeg su ćelije izložene delovanju ekstrakta, skratilo na 2 h. Test je izveden u skladu sa detaljnim uputstvima proizvođača. Ukratko, 1×10^4 ćelija zasejano je u standardne mikroploče sa 96 bunara, preinkubirano 24 h, a zatim su u radne probe dodati ekstrakti, a u negativne kontrole rastvarač. Sve probe su radjene u četiri ponavljanja. Nakon inkubacije od 2 h, mikroploče su centrifugirane, a supernatant odvojen i korišćen za određivanje nekroze. Ćelije su zatim lizirane, centrifugirane, a lizati odvojeni za određivanje apoptoze. Odmereno je 20 μL supernatanta ili lizata u mikroploče obložene streptavidinom i 80 μL imuno-reagensa (smeša antitela), a zatim inkubirano 2 h uz mešanje. Sve probe su urađene u duplikatu. S

obzirom da i supernatanti i lizati sadrže oligonukleozome, dolazi do interakcije sa anti-histon antitelima obeleženim biotinom i vezivanja za streptavidin, kao i do reakcije sa anti-DNA antitelima sa peroksidazom. Mikroploče su isprane puferom, a zatim je dodat supstrat peroksidaze – ABTS. Razvoj boje praćen je pomoću fotometra Multiscan Ascent (Labsystems; Helsinki, Finland) na 405 nm, dok je očitavanje na 492 nm korišćeno za uklanjanje apsorbance pozadine.

Vrednost apsorbance na 492 nm oduzeta je od srednje vrednosti apsorbanci očitanih na 405 nm za datu probu. Step en apoptoze ili nekroze izražen je kao faktor povećanja koncentracije mono- i oligonukleozoma (EF), koji je računat kao A_T/A_C , gde je A_T absorbanca probe tretirane ekstraktom, standardom ili lekom, a A_C absorbanca negativne kontrole (samo rastvarač). Odnos apoptoza/nekroza (A/N) izračunat je za svaku probu i kontrolu na osnovu odgovarajućih apsorbancija. Porast apoptoze (AI) dobijen je deljenjem EF apoptoze sa EF nekroze (Četojević-Simin i drugi, 2015).

4. Rezultati i diskusija

4.1. HEMIJSKI SASTAV VRSTA RODA *ALLIUM* SECT. *CODONOPRASUM*

Hemijski sastav vrsta roda *Allium* sect. *Codonoprasum* do sada je vrlo malo ispitivan. Kusterer i saradnici (2010) i Fritsch i Keusgen (2006) odredili su sadržaj odabranih cistein-sulfoksida u pojedinim vrstama ove sekcije, Anačkov (2009) je pratio zastupljenost šest flavonoidnih aglikona (luteolina, kvercetin, apigenin, kemferol, trichin i miricetin) u osam taksona sect. *Codonoprasum*, a Curcic i saradnici (2012) su odredili sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima vrste *A. flavum*. Pored ovih nekoliko radova, u literaturi nema drugih podataka o hemijskom sastavu vrsta sect. *Codonoprasum*.

U ovom poglavlju prikazani su i diskutovani rezultati ispitivanja hemijskog sastava ekstrakata 10 taksona roda *Allium* sect. *Codonoprasum*. U okviru ovih ispitivanja urađena je analiza volatilnih komponenti *headspace* GC-MS (HS-GC-MS) tehnikom, kvalitativna analiza metanolnih ekstrakata primenom tečnehromatografskih metoda (LC-DAD-MS i LC-MS-MS) i kvantitativna analiza odabranih fenolnih jedinjenja primenom LC-MS/MS tehnike. Pored toga, određen je sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i antocijana u ekstraktima, kao i aktivnost aliinaze, primenom spektrofotometrijskih metoda.

4.1.1 *Headspace* GC-MS (HS-GC-MS) analiza volatilnih komponenti

Isparljiva sumporna jedinjenja, nastala nakon dezintegracije ćelija svežih lukovica ispitivanih vrsta roda *Allium*, analizirana su tehnikom kapilarne gasne hromatografije kuplovane sa masenospektrometrijskom detekcijom (GC-MS). Seckanjem svežih lukovica iz vakuola se oslobađa enzim aliinaza, koji razlaže *S*-alk(en)il-cistein-sulfokside (ACSO) na pirogroždanu kiselinu, amonijak i alk(en)il-sulfensku kiselinu. Alk(en)il-sulfenska kiselina je hemijski nestabilna i podleže reakciji kondenzacije sa još nekim koreaktantom, najčešće sa još jednim iste vrste, gradeći tiosulfinate. Tiosulfinati su takođe nestabilni i dalje se raspadaju na različita uglavnom isparljiva jedinjenja koja zapravo daju aromu lukovima. U ovom radu korišćena je statička *headspace* tehnika (HS-GC-MS), koja ima mnogobrojne prednosti u odnosu na klasičnu tehniku hidroddestilacije etarskog ulja koje se injektuje na kolonu. Naime kod HS-GC-MS, vreme pripreme uzorka je mnogo kraće, potrebna količina uzorka mnogo manja, nema gubitka lako isparljivih komponenti niti degradacije termolabilnih komponenti, dok u inlet gasnog hromatografa dospevaju samo isparljive komponente uzorka čime se kolona štiti od zagađenja. Glavni nedostatak ove tehnike je što se ne može koristiti za analizu komponenti prisutnih u uzorku u malim količinama (granica detekcije je visoka).

Isparljive komponente su identifikovane na osnovu poređenja njihovih masenih spektara sa spektrima iz biblioteka, a relativni udeli jedinjenja određeni su metodom normalizacije na osnovu površine pikova u TIC (*total ion chromatogram*).

Hromatogrami dobijeni HS-GC-MS analizom ispitivanih uzoraka dati su u *Prilogu 8.2.* (*Slike 8.1– 8.5.*), a rezultati dobijeni analizom ovih hromatograma i masenih spektara dati su u *Tabeli 4.1.*

Iz prikazanih rezultata jasno se uočava da je dimetil-disulfid ubedljivo najdominantnija isparljiva komponenta u uzorcima svih ispitivanih vrsta sect. *Codonoprasum* (relativni udeo od 70,7 do 100%), iz čega se može zaključiti da je metiin (*S*-metil-L-cistein-sulfoksid) dominantan ACSO u svežim lukovicama ovih vrsta, što je u skladu sa ranije objavljenim podacima (Kusterer i drugi, 2010; Fritsch i Keusgen, 2006). Ovde se naročito izdvajaju *A. flavum*, *A. oleraceum*, *A.*

melanantherum, *A. rhodopeum*, *A. carinatum* subsp. *pulchelum*, *A. fuscum* subsp. *gracile* i *A. paniculatum*, kod kojih je primenjenom metodom dokazano prisustvo dimetil-disulfida kao jedine isparljive komponente. Ovako karakterističan profil isparljivih komponenti mogao bi poslužiti u hemotaksonomske svrhe, s obzirom da se bitno razlikuje od profila belog i crnog luka dobijenog HS-GC-MS analizom (Rose i drugi, 2005; Kallio i Salorinne, 1990; Božin, 2003; Block i drugi, 1992), kao i od profila predstavnika tipične sect. *Allium* (Božin, 2009).

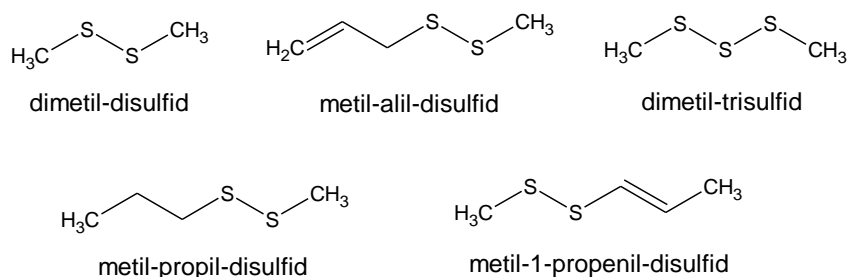
U vrstama *A. pallens*, *A. carinatum* subsp. *carinatum* i *A. fuscum* subsp. *fuscum* pored dimetil-disulfida, identifikovane su i male količine drugih sulfidnih jedinjenja: metil-1-propenil-disulfida, metil-propil-disulfida i dimetil-trisulfida u sve tri vrste, i metil-alil-disulfida u vrstama *A. carinatum* subsp. *carinatum* i *A. fuscum* subsp. *fuscum* (Slika 4.1.). Ovi podaci ukazuju da se pored metiina u navedenim vrstama nalaze i drugi ACSO (prekursori isparljivih jedinjenja), verovatno izoaliin i propiin, ali u znatno manjim količinama od metiina.

Podaci o sastavu volatilnih komponenti vrsta *A. melanantherum*, *A. rhodopeum*, *A. fuscum*, *A. paniculatum* i *A. pallens* su prvi put objavljeni u ovom radu.

Tabela 4.1. Rezultati HS-GC-MS analize

Takson	Lokalitet	Jedinjenje						
		t _R (min)	Propil-merkaptan 1,86	Dimetil-disulfid 2,66	Metil-alil-disulfid 4,74	Metil-propil- disulfid 4,98	Metil-1-propenil- disulfid 5,12	Dimetil-trisulfid 5,65
			Relativni udeo (%)					
<i>A. flavum</i> subsp. <i>flavum</i>	Klisura Dervente	-	95,2	1,3	-	3,5	-	
	Titelski Breg	-	100	-	-	-	-	
	Zaovine	-	98,1	0,9	-	1,0	-	
	Vršački Breg	-	100	-	-	-	-	
	Babušnica	-	100	-	-	-	-	
	Tara	-	100	-	-	-	-	
	Klisura Jerme	-	100	-	-	-	-	
<i>A. oleraceum</i>	Rtanj	-	100	-	-	-	-	
	Kosmovac	-	100	-	-	-	-	
<i>A. melanantherum</i>	Čemernik	-	100	-	-	-	-	
	Plana	-	100	-	-	-	-	
<i>A. pallens</i>	Beli Rzav	-	70,7	-	5,1	21,1	3,1	
<i>A. rhodopeum</i>	Dimitrovgrad	-	100*	-	-	-	-	
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchelum</i>	Vlasinsko jezero	-	100	-	-	-	-	
	Tara	-	100	-	-	-	-	
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i>	Kaluđerske Bare	2,3	76,1	0,0	8,5	9,2	4,0	
	Klisura Dervente	-	94,2	1,7	1,3	2,0	0,9	
	Čemernik	-	100	-	-	-	-	
	Tara	-	100	-	-	-	-	
	Rtanj	-	91,8	-	3,5	3,0	1,7	
<i>A. fuscum</i> subsp. <i>fuscum</i>	Klisura Dervente	-	94,2	0,5	0,4	2,4	2,4	
	Zaovine	-	93,0	-	0,7	4,6	1,7	
	Beli Rzav	-	100	-	-	-	-	
	Rtanj	-	100	-	-	-	-	
<i>A. fuscum</i> subsp. <i>gracile</i>	Tara	-	100	-	-	-	-	
<i>A. paniculatum</i>	Titelski breg	-	100*	-	-	-	-	

* Vrlo nizak sadržaj isparljivih jedinjenja.



Slika 4.1. Strukture volatilnih komponenti detektovanih u vrstama sect. *Codonoprasum*

4.1.2 Kvalitativna analiza metanolnih ekstrakata primenom LC-DAD-MS i LC-MS-MS

Za preliminarni skrining jedinjenja ekstrahovanih iz biljnog materijala 70% (v/v) metanolom korišćena je reverznofazna tečna hromatografija kuplovana sa UV/VIS i tandemskom masenom spektrometrijom (LC-DAD-MS). Ova tehnika je jedna od najčešće korišćenih tehnika za preliminarnu identifikaciju i kvantitaciju sekundarnih biomolekula biljaka. Za jonizaciju je korišćen elektrosprej jonski izvor (ESI), koji omogućava detekciju svih jedinjenja sa funkcionalnim grupama koje se mogu jonizovati u kiselobaznim reakcijama ili građenjem adukata sa jonima iz rastvora. Uzorci su analizirani u pozitivnom MS2Scan modu, a kao mobilna faza korišćena je binarna faza sastavljena od 0,1% vodenog rastvora HCOOH i metanola. Mravlja kiselina obezbeđuje protone neophodne za građenje željenih $[M+H]^+$ adukata u pozitivnom modu, kao i bolju hromatografiju kiselih jedinjenja usled supresije jonizacije. Dobijeni BPC i DAD (290 nm) hromatogrami prikazani su u *Prilogu 8.3.* (Slike 8.6.-8.16.), dok su ESI(+) MS¹ (MS2Scan) i UV spektri detektovanih jedinjenja prikazani u *Tabeli 8.2* u *Prilogu 8.3.*

Jedinjenja su identifikovana na osnovu poređenja retencionih vremena, masenih i UV spektara sa referentnim jedinjenjima, ili preliminarno identifikovana poređenjem sa literaturnim podacima ili tumačenjem UV i MSⁿ spektara. Za svaki pik, najpre je ekstrahovan MS¹ spektar u pozitivnom modu snimanja i iz njega očitani dominantni joni. Molekulska masa jedinjenja određena je iz masenih spektara prvog reda, putem asignacije bar dve jonske vrste. Moguće jonske vrste u pozitivnom modu su adukti molekula i dimera sa protonom ($[M+H]^+$ i $[2M+H]^+$), jonima alkalnih metala ($[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[2M+Na]^+$) i amonijum-jonom ($[M+NH_4]^+$). S obzirom da je koncentracija svih analiziranih ekstrakta bila ~20 mg/g SE, bilo je moguće poređenjem visine pikova istih jedinjenja doneti zaključke o njihovoj relativnoj zastupljenosti u ekstraktu.

Fenolna jedinjenja imaju karakteristične UV apsorpcione spektre, koji se koriste prvenstveno za identifikaciju klase jedinjenja. Tako, derivati fenilpropenskih kiselina pokazuju apsorpcione trake na ~240 nm i ~330 nm (sa *shoulder*-om na ~300 nm), flavonoli na 250–270 nm i 320–360 nm, flavoni na 210–230 nm, 250–280 nm i 330–350 nm. Apsorpcioni maksimumi flavonoida potiču od prstena A i B, a označavaju se kao *traka I* i *traka II*. Apsorpcioni maksimum *trake I* nalazi se u intervalu između 300 i 400 nm i potiče od prstena A (i prstena C), dok se apsorpcioni maksimum *trake II* nalazi između 240 i 285 nm i potiče od prstena B (Markham, 1982). UV spektri su naročito korisni za razlikovanje jedinjenja sa istom molekulskom masom, kao što su flavonoidni aglikoni luteolin i kemferol. Sličnost UV spektara može ukazati i na strukturnu sličnost različitih jedinjenja, tj. na postojanje zajedničkog strukturnog elementa.

U ESI, u zavisnosti od uslova jonizacije, može da dođe do delimične fragmentacije slabih veza. Na ovaj način MS¹ spektri istovremeno sadrže i pseudo-MS² spektre glikozida, koji pružaju informacije o molekulskoj masi aglikonskog dela molekula (čime, istovremeno, omogućavaju i

karakterizaciju šećerne komponente). Zbog toga se, u nekim slučajevima, već na osnovu MS¹ spektra može preliminarno identifikovati jedinjenje. Međutim, za dobijanje potpunijih informacija neophodni su MSⁿ eksperimenti. Za odabrane pikove snimljeni su MS² spektri [M+H]⁺ jona. Za akviziciju MS² spektara korišćen je Product Ion Scan mod, koji podrazumeva odvajanje željenog prekursora od ostalih jona na prvom kvadrupolu (Q1), njegovu disocijaciju u kolizionoj ćeliji (q) pri nekoliko različitih kolizionih energija (0–40 V, sa inkrementima 10 V), i zatim skeniranje nastalih fragmenata na trećem kvadrupolu (Q3).

Pored toga, snimljeni su i pseudo-MS³ spektri odabranih jona (655, 493, 331, 317) detektovanih u MS¹, pri kolizionoj energiji od 35 V i primenom visokog napona fragmentora (u opsegu od 100 V do 220 V) koji dovodi do fragmentacije već u jonskom izvoru. Nastali fragmenti dalje se u QqQ analizatoru tretiraju kao prekursori – joni filtrirani na Q1 se usmeravaju u kolizionu ćeliju gde se dalje fragmentišu (napon koliziona ćelije podešen na 35 V).

Za skrining jedinjenja sa zajedničkim strukturnim karakteristikama, kao što su flavonoidni glikozidi, korišćen je Precursor Ion Scan mod. Ovaj mod podrazumeva detekciju prekursora koji pri datim uslovima u kolizionoj ćeliji, daju određeni fragment (npr. jon aglikona). Praćeni su joni flavonoidnih aglikona kvercetina ($m/z = 303$ u pozitivnom modu) kemferola i luteolina ($m/z = 287$ u pozitivnom modu) i metil-kveretina ($m/z = 317$ u pozitivnom modu).

Joni aglikona flavonoida nastaju ocepjenjem šećerne komponente O-glikozida uz zadržavanje glikozidnog O-atoma na aglikonskom jezgru (Orčić, 2010). U pozitivnom modu flavonoidni glikozidi se obično protonuju na karbonilnom O-atomu, a zatim se glikozidna veza raskida homolitički ili heterolitički, pri čemu se formira radikal-katjon ili katjon. Ocepjenje šećera dovodi do $\Delta m/z$ od 162 u slučaju heksoza, 146 kod deoksiheksoza, 132 kod pentoza i 176 u slučaju heksuronskih kiselina.

Detektovana jedinjenja u uzorcima vrsta *A. carinatum* subsp. *pulchellum*, *A. carinatum* subsp. *carinatum*, *A. fuscum* var. *gracile*, *A. fuscum* var. *fuscum*, *A. flavum* subsp. *flavum*, *A. melanatherum*, *A. paniculatum* subsp. *marginatum*, *A. pallens* subsp. *tenuiflorum*, *A. rhodopeum* i *A. cepa* sumarno su prikazana u Tabeli 4.2. Ukupno je detektovano 44 jedinjenja, od kojih je 29 preliminarno identifikovano na osnovu MS¹, MS², pseudo-MS³ i UV spektara. Molekulske mase jona iz masenih spektara ovih jedinjenja i UV maksimumi očitani iz UV/VIS spektara, prikazani su u Prilogu 8.3. (Tabela 8.3.).

Za identifikaciju jedinjenja A-02, A-03, A-04, A-05, A-20, A-29 i A-33 nije bilo dovoljno podataka na osnovu MS¹ spektara pa je za ove jone urađena Product Ion Scan analiza, a kao reprezentativan uzorak odabran je ekstrakt *A. pallens* zbog dobrog razdvajanja komponenata i dovoljnog intenziteta pikova u hromatogramu.

Jedinjenja A-02 i A-03 identifikovana su kao aminokiseline leucin/izoleucin i fenilalanin, respektivno, na osnovu Product Ion Scan-a (Slika 8.17 u Prilogu 8.3). Molekulska masa od 131 odgovara Leu/Ile. Gubici CO i H₂O ukazuju na prisustvo karboksilne grupe a gubitak NH₃ na prisustvo amino-grupe. Spektar je saglasan sa literaturnim podacima za ESI-MS spektre Leu i Ile (Rogalewicz i drugi, 2000). Molekulska masa od 165 odgovara Phe, a jon 120 nastaje fragmentacijom Phe (Rogalewicz i drugi, 2000).

Tabela 4.2. Jedinjenja identifikovana primenom LC-DAD-MS i LC-MS-MS tehnikе u metanolnim ekstraktima vrsta sect. *Codonoprasum*

Oznaka	t _R [min]	Jedinjenje (Identifikacija na osnovu MS ¹ , MS ² , pseudo-MS ³ i UV spektara)	<i>A.fuscum</i> var. <i>fuscum</i> Beli Rzav	<i>A.fuscum</i> var. <i>gracile</i> Tara	<i>A. rhodopeum</i> , Dimitrovgrad	<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchellum</i> , Tara	<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i> Tara	<i>A. melanatherum</i> Černik	<i>A. pallens</i> , B. Rzav	<i>A. paniculatum</i> , Titelski breg	<i>A. flavum</i> , Klisura Jerme	<i>A. oleraceum</i> , Kosmovac	<i>A. cepa</i> , Neradin
A-01	0,665	n. i.									+++		
A-02	0,81	Leu/Ile	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
A-03	1,04	Phe	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
A-04	1,21	jedinjenja sa 2 sumporna atoma					++	++	+++		+++		
A-05	1,52	Trp	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	
A-06	1,81	γ-glutamyl-S-propenil-L-cistein [#]					+++		+++	+	+		
A-07	1,94	n. i.						++					
A-08	2,03	n. i.			+								
A-09	2,18	MeQuer Hex ₂ *	+	+		+	+	+		+			
A-10	2,39	Quer-3,x-Hex ₂					+		+	+	+		
A-11	2,77	MeQuer Hex ₂ *			+						+		
A-12	3,35	MeQuer HexHexA *	+	+	+			+		+			
A-13	3,50	MeQuer HexHexA *	+										
A-14	3,59	MeQuer Hex ₂ *	+	+	+	+	+			+	+		
A-15	4,08	Quer-3,x-Hex ₂							+				+
A-16	4,46	(Kemferol/Luteolin) Hex ₂	+	+	+	+	+			+			
A-17	4,7	Quer dHex ₂ Hex (Quer(Rha)(RhaGlc) / Quer(Rha ₂ Glc)				+	+						
A-18	4,87	Quer dHex Hex			+					+			
A-19	4,98	MeQuer Hex ₂ *	+	+		+			+	+	+		
A-20	5,236	Quer-3,5-Hex ₂							++				
A-21	5,72	Kemferol dHex ₂ Hex				+							
A-22	5,89	n. i.	+	+		+	+			+	+		

Oznaka	t _R [min]	Jedinjenje (Identifikacija na osnovu MS ¹ , MS ² , pseudo-MS ³ i UV spektara)	<i>A. fuscum</i> var. <i>fuscum</i> Beli Rzav	<i>A. fuscum</i> var. <i>gracile</i> Tara	<i>A. rhodopeum</i> , Dimitrovgrad	<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchellum</i> , Tara	<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i> Tara	<i>A. melanantherum</i> Čemernik	<i>A. pallens</i> , B. Rzav	<i>A. paniculatum</i> , Titelsski breg	<i>A. flavum</i> , Klisura Jerme	<i>A. oleraceum</i> , Kosmovac	<i>A. cepa</i> , Neradin
A-23	5,95	Quer-3- <i>O</i> -Hex							++				
A-24	6,09	MeQuer HexPent *			+					+	+		
A-25	6,25	rutin	++	++	+	++	+	+++		++	++		
A-26	6,18	Quer-3- <i>O</i> -Hex							+				
A-27	6,30	n. i.	+	+	++	+	+		+	+	+	+	
A-28	6,53	Quer dHex ₂					+						
A-29	6,62	n.i.	+	+	+	+	+		+				
A-30	6,70	Quer-3- <i>O</i> -Pent					+			++	+		
A-31	7,24	n. i.	++	++		++	+	+	++	+	+		
A-32	7,62	(Kemferol/Luteolin)-3- <i>O</i> -Hex	+	+	+	+	+	+	+		+		
A-33	7,90	n. i.	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	++
A-34	8,00	MeQuer Hex *	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
A-35	8,17	MeQuer dHexHex *	+	+	+			+		+	+		
A-36	8,30	n. i.	++	++	+	++	++	+	+	++		++	++
A-37	8,55	n. i.				+							
A-38	9,03	n. i.	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
A-39	9,78	n. i.		++									
A-40	10,0	n. i.								++			
A-41	10,10	n. i.	+	+++									
A-42	5,09	Kemferol Hex ₂											++
A-43	7,04	Quer Hex											+
A-44	9,09	Quer											++

[#]γ-glutamyl-S-propenil-L-cistein ili γ-glutamyl-S-alil-L-cistein, *MeQuer – ramnetin ili izoramnetin, Quer – kvercetin, Hex – heksozil, Pent – pentozil, dHex – deoksiheksozil, HexA – heksuronska kiselina

Jedinjenje A-05 identifikovano je kao triptofan na osnovu poređenja njegovog MS² spektra sa spektrima Trp iz NIST biblioteke, snimljenim pri istim uslovima (Slika 8.18 u Prilogu 8.3).

Za jedinjenje A-20 na osnovu MS¹ spektra zaključeno je da se radi o diheksozil-kvercetin (QuerHex₂), a iz UV spektra da je jedna heksoza vezana glikozidnom vezom na C-3 kvercetina. S obzirom da se glikozidna veza na C-3 relativno lako raskida (lakoća raskidanja $5 > 3 > 3' = 5' > 4 > 7$ (Cuyckens i Claeys, 2004)), očekivao bi se jak signal jona 465 u MS² spektru ovog jedinjenja, međutim ovaj signal je veoma slab, dok je signal jona aglikona (303) jak (Slika 7.18. u Prilogu 8.3). Iz ovoga proizilazi da je druga heksoza vezana za C atom na kome se glikozidna veza još lakše raskida nego na C-3, a to je C-5. Iz svega navedenog zaključeno je da je A-20 kvercetin-3,5-diheksozil (Quer-3,5-Hex₂). U literaturi je poznat kvercetin-3,5-digalaktozid (Buckingham, 2007).

Jon 641 javlja se u MS¹ spektru komponenata A-09, A-11 i A-14. U MS2Scan eksperimentu došlo je do njegove delimične fragmentacije u jonskom izvoru do jona 479 (što odgovara gubitku jednog ostatka heksoze, $\Delta m/z=162$), ali ne i do aglikona. Na osnovu UV spektra pretpostavljeno je da se radi o derivatu kvercetina, što ukazuje na to da je u pitanju MeQuerHex₂ ili QuerHexHexA. Da bi se identifikovala korektna struktura, snimljeni su PI MS² spektri u Product Ion Scan modu za uzorak *A. rhodopeum*, iz kojih se vidi da jon 641 pri svim primenjenim kolizionim energijama daje jon 317 karakterističan za metilkvercetin (najverovatnije ramnetin ili izoramnetin) (Slika 7.19. u Prilogu 8.3), pa je zaključeno da su jedinjenja A-09 i A-11 diheksozidi ramnetina ili izoramnetina (MeQuerHex₂). Jedinjenje A-14 nije dalo dovoljno intenzivan signal u Product Ion Scan hromatogramu uzorka *A. rhodopeum*, pa je snimljen Precursor Ion Scan za jon 317 u pozitivnom i 315 u negativnom modu za uzorak *A. pallens*, čime je potvrđeno da jon 641 (u pozitivnom modu) i 639 (u negativnom modu) jedinjenja A14 daju jon 317/315 (Slika 8.20. u Prilogu 8.3), odn. da je u pitanju MeQuerHex₂.

Jedinjenje A-21 detektovano je samo u taksonu *A. carinatum* subsp. *pulchelum*, a na osnovu jona u MS¹ spektru može se zaključiti da se radi o luteolin- ili kemferol-deoksiheksozil-diheksozidu. UV spektar ukazuje na kemferol kao verovatniji aglikon, sa supstitucijom u položaju 3. Može se, stoga, pretpostaviti da je jedinjenje A-21 kemferol-bis(deoksiheksozil)-heksozid (Kemferol-dHex₂Hex).

Jon 655 koji se javlja u MS¹ spektrima jedinjenja A-12 i A-13 je samo delimično fragmentisan do jona 493, što odgovara gubitku jedne heksoze ($\Delta m/z=162$). Da bi se zaključilo koji aglikon je u pitanju, urađen je Product Ion Scan na uzorku *A. fuscum* var. *gracile* i utvrđeno da se jon 493 dalje fragmentiše do jona 317 ($\Delta m/z=176$), što odgovara gubitku ostatka heksuronske kiseline (Slika 8.21. u Prilogu 8.3). Takođe, iz pseudo-MS³ spektra jona 317 (napon fragmentora 220 V i napon kolizije ćelije 35 V), zapaža se jon 302 ($\Delta m/z=15$ odgovara metil grupi), što ukazuje da jon 317 potiče od *O*-metilkvercetina – ramnetina ili izoramnetina. Ovi podaci ukazuju da su komponente A-12 i A-13 heksozil heksuronidi ramnetina ili, verovatnije, izoramnetina (MeQuerHexHexA).

Radi detekcije svih komponenata u čijoj strukturi se nalazi kvercetin, urađen je i pseudo MS³ eksperiment za jone 303 u pozitivnom modu, pri naponu fragmentora od 240 V i kolizionim energijama od 10 V do 40 V. Ovim eksperimentom potvrđeno je prisustvo 5 derivata kvercetina u ekstraktu *A. pallens* (Slika 8.22 u Prilogu 8.3).

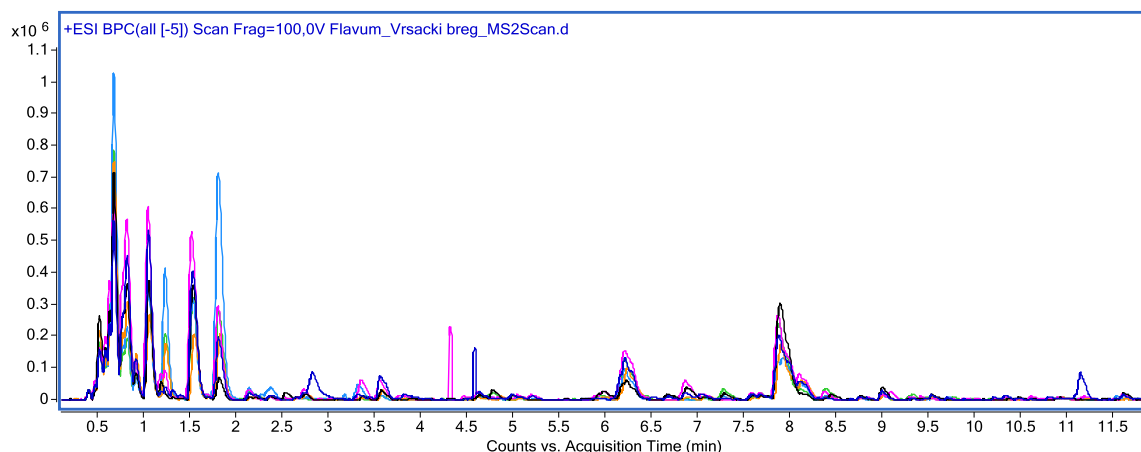
U delu MS2Scan hromatograma, $t_R = 7.8-8.3$, uzorka *A. flavum*, Mokra Gora, nalazi se pik sa jonima 625, 501, 479, 317 i 314 (Slika 8.24 u Prilogu 8.3). Na osnovu EIC hromatograma za jone 625, 479 i 317 utvrđeno je da se radi o preklapljenim pikovima tri različita jedinjenja (Slika 8.23 u Prilogu 8.3). U Product Ion Scan eksperimentu na uzorku *A. flavum* (Babušnica) potvrđeno je da jedinjenju A-35 pripadaju joni 625, 479 i 317, pa je pretpostavljeno da se radi o MeQuer

dHexHex (Slika 8.24. u Prilogu 8.3). U istom eksperimentu dobijen je i pseudo-MS³ spektar jona 317 (napon fragmentora 180 V i napon kolizione ćelije 35 V) (Slika 8.25. u Prilogu 8.3), u kome se zapaža jon 302 ($\Delta m/z=15$ odgovara metil grupi), što ukazuje da jon 317 potiče od *O*-metilkvercetina – ramnetina ili izoramnetina (koji je detektovan i u slobodnom stanju u značajnim količinama – Poglavlje 4.1.2). Product Ion Scan analizom potvrđeno je da joni 479 i 317 pripadaju jedinjenju A-34, što ukazuje da je ovo jedinjenje monoglikozidu metilkvercetina (MeQuerHex) (Slika 8.24. u Prilogu 8.3). Jon 314 potiče od jedinjenja A-33 koje nije identifikovano.

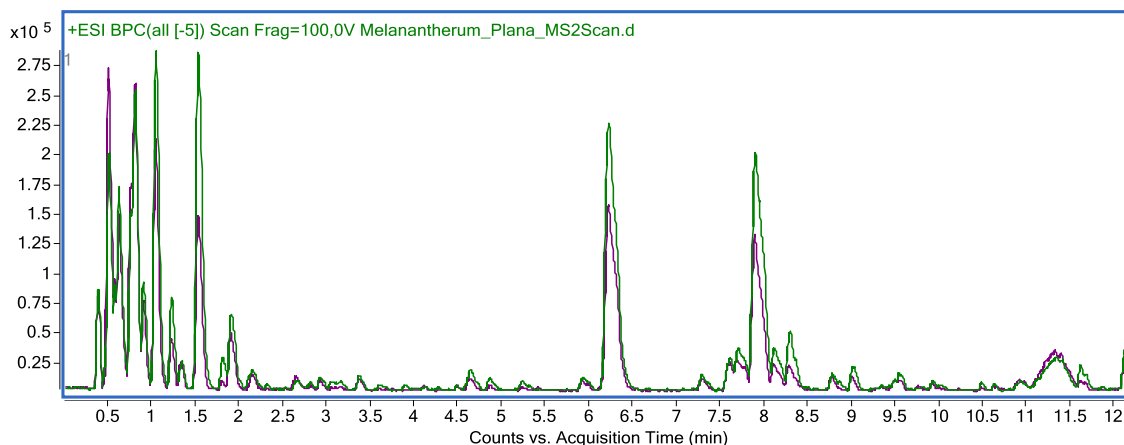
Identifikacija jedinjenja A-04, A-29 i A-33, ni nakon Product Ion Scan eksperimenta nije bila moguća, iako je za A-04 na osnovu karakterističnih M+2 izotopskih pikova u MS¹ spektru zaključeno da sadrži dva sumporna atoma (Slika 8.26. iz Priloga 8.3.) Jedinjenje A-06 identifikovano je kao γ -glutamil-S-(1-propenil)-L-cistein ili γ -glutamil-S-alil-L-cistein, na osnovu molekulske mase i M+2 izotopskih pikova u MS¹ spektru i literaturnih podataka (Buckingham, 2007).

Kusterer je 2010. godine u vrsti *A. flavum* dokazao prisustvo metiina i S-(2-piridil)-L-cistein sulfoksida, a u vrstama *A. carinatum* i *A. oleraceum* pored metiina pronađeni su i izoaliin i aliin (Kusterer je 2010; Fritsch i Keusgen, 2006). Ova jedinjenja nisu detektovana u MS2Scan hromatogramima ispitivanih ekstrakata, najverovatnije iz razloga što zbog velike polarnosti izlaze na početku hromatograma zajedno sa drugim polarnim primesama, pa su pikovi preklapljeni. Još jedna poteškoća u identifikaciji sumpornih komponenti lukova je nedostatak komercijalnih standarda. Za detekciju i identifikaciju ovih jedinjenja potrebna bi bila dodatna MSⁿ i NMR analiza uz prethodno prečišćavanje ekstrakata.

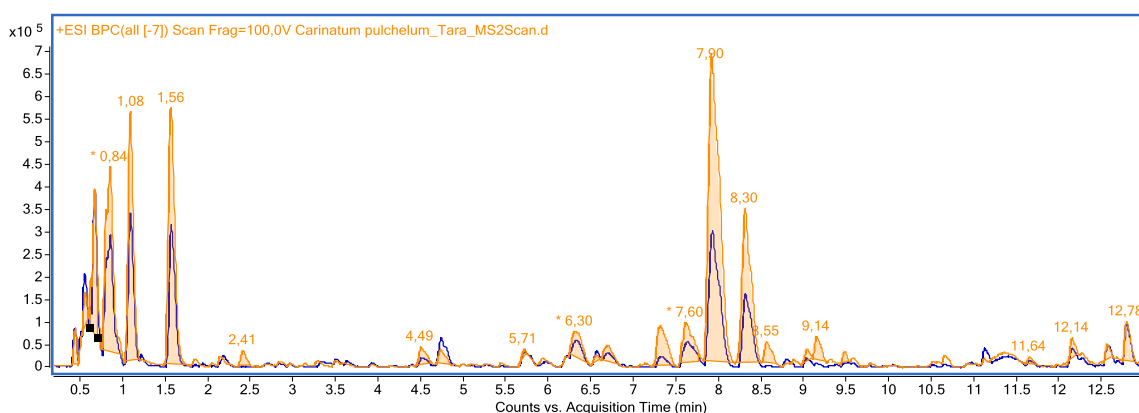
Za neke vrste urađena je MS2Scan analiza za uzorke sakupljene sa različitih lokaliteta u Srbiji. Iz preklapljenih BPC hromatograma šest uzoraka vrste *A. flavum* subsp. *flavum* (Slika 4.2.), dva uzorka *A. melanantherum* (Slika 4.3.) i dva uzorka *A. carinatum* subsp. *pulchelum* (Slika 4.4.) vidi se da nema bitne razlike u kvalitativnom sastavu između uzoraka iste vrste sa različitih lokaliteta. U ekstraktima vrsta *A. flavum* i *A. melanantherum* sa različitih lokaliteta uočavaju se razlike u kvantitativnom sastavu aminokiselina sa početka hromatograma (Phe, Trp i Leu/Ile) i sumpornog jedinjenja A-04. Takođe, postoji razlika u sadržaju neidentifikovanih jedinjenja A-33 i A-36 između uzoraka vrste *A. carinatum* subsp. *pulchelum* sa različitih lokaliteta, kao i između uzoraka *A. melanantherum*. Ovo ukazuje da faktori sposaljnje sredine ne dovode do značajne varijabilnosti u kvalitativnom sastavu vrste, već utiču samo na sadržaj pojedinih komponenti.



Slika 4.2. Preklapljeni BPC hromatogrami ekstrakata *A. flavum* subsp. *flavum* sa šest lokaliteta

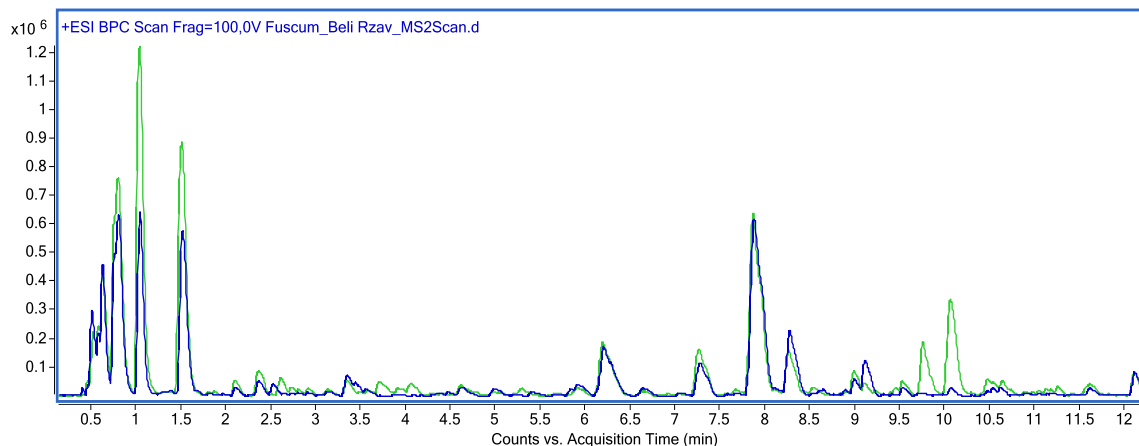


Slika 4.3. Prekljopljene BPC hromatogrami ekstrakata *A. melanantherum* sa dva lokaliteta



Slika 4.4. Prekljopljene BPC hromatogrami ekstrakata *A. carinatum* subsp. *pulchelum* sa dva lokaliteta

Iz hromatograma sa *Slike 4.5* se može zaključiti da između dva varijeteta vrste *Allium fuscum* nema značajnijih razlika u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu. Uočljive su razlike u sadržaju amino kiselina (A-02, A-03 i A-05) i ne-fenolnog jedinjenja A-41, dok kvalitativna razlika postoji u slučaju nepolarne neidentifikovane komponente A-39, koja je zastupljena samo u varijetetu *gracile*. Iz ovoga se može pretpostaviti da bi komponenta A-39 mogla poslužiti kao hemotaksonomski marker varijeteta *gracile*, ali su za potvrdu ove pretpostavke i identifikaciju ovog jedinjenja neophodna dodatna istraživanja.



Slika 4.5. Prekljopljene BPC hromatogrami ekstrakata *A. fuscum* var. *fuscum* i *A. fuscum* var. *gracile*

Od 29 identifikovanih jedinjenja (Tabela 4.2.), 25 su iz klase flavonoida, gde su daleko najdominantniji derivati kvercetina (12 glikozida kvercetina i 9 glikozida metil-kvercetina (ramnetina ili izoramnetina)). Derivati kvercetina nalaze se u svim vrstama, što je u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima (Anačkov, 2009). Preostala četiri detektovana flavonoida su glikozidi kemferola ili luteolina. Svi derivati kvercetina u vrstama sect. *Codonoprasum* prisutni su u obliku glikozida, za razliku od crnog luka gde je kvercetin zastupljen i u obliku aglikona. Dominantni flavonoidi u ekstraktu *A. cepa* su aglikon kvercetin i njegov mono- i diheksozid, kao i kemferol-diheksozid (A-15, A-42, A-43 i A-44), što je u skladu sa literarnim podacima (Price i Rhodes, 1997; Park i Lee, 1996). Specifično za vrstu *A. carinatum* subsp. *pulchelum* je prisustvo glikozida luteolina (A-21).

Rutin je u izrazito visokoj koncentraciji zastupljen u vrsti *A. melanantherum*, u nešto manjoj u vrstama *A. fuscum*, *A. flavum*, *A. paniculatum* i *A. carinatum* subsp. *pulchelum*, zatim u maloj koncentraciji u vrstama *A. rhodopeum* i *A. carinatum* subsp. *carinatum*, dok u vrstama *A. pallens* i *A. oleraceum* nije uopšte prisutan.

Vrsta *A. pallens* se i po sastavu ostalih flavonoida najviše izdvaja od ostalih vrsta sect. *Codonoprasum*. Naime glikozidi kvercetina obeleženi kao komponente A-15, A-20, A-23 i A-26 prisutni su samo u ovoj vrsti. Takođe, vrsta *A. oleraceum* se razlikuje od ostalih po tome što u njenom MS2Scan hromatogramu nisu nađeni pikovi identifikovanih flavonoida, pa se pretpostavlja da je koncentracija ovih jedinjenja, ako su prisutna, suviše mala da bi bila detektovana ovom metodom.

Sve tri identifikovane aminokoseline (Phe, Trp i Leu/Ile) zastupljene su u svim ispitivanim vrstama sect. *Codonoprasum* u velikoj količini.

4.1.3 Kvantitativna analiza odabranih fenolnih jedinjenja primenom LC-MS/MS tehnike

Sadržaj hinske kiseline i 44 odabrana fenolna jedinjenja (14 fenolnih kiselina, 25 flavonoida, 3 kumarina i 2 lignana) u ekstraktima deset taksona roda *Allium* sect. *Codonoprasum* sa ukupno devetnaest lokaliteta određen je primenom visoko selektivne i specifične LC-MS-MS tehnike. Analizirani su ekstrakti lukovica i ekstrakti nadzemnih delova biljaka. Jedinjenja su praćena u dinamičkom SRM (*selected reactions monitoring*) modu. Površine pikova standardnih fenolnih jedinjenja, korišćene za konstruisanje kalibracionih krivih, date su u Tabeli 8.4. u Prilogu 8.4., a kalibracione krive na osnovu kojih je izračunat sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima na Slikama 8.27.–8.30. u Prilogu 8.4. Preklopljeni ESI-SRM hromatogrami za detektovana jedinjenja u ekstraktima prikazani su na Slikama 8.31.–8.39. u Prilogu 8.4, a površine pikova očitane sa ovih hromatograma i koncentracije detektovanih fenolnih jedinjenja izračunate iz kalibracionih krivih u Tabelama 8.5.–8.9. u Prilogu 8.4. Sadržaji kvantifikovanih jedinjenja u $\mu\text{g g}^{-1}$ suvog ekstrakta dati su u Tabelama 4.3.–4.7.

Tabela 4.3. Sadržaj ispitivanih fenolnih jedinjenja i hinske kiseline u metanolnim ekstraktima vrste *A. flavum* subsp. *flavum* sa različitim lokaliteta

		Koncentracija jedinjenja u ekstraktu ($\mu\text{g g}^{-1}$ suvog ekstrakta) ^a							
Lokalitet		Dimitrovgrad		Babušnica		Vršački breg		Klisura Jerme	
Deo biljke		nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica
<i>Fenolne kiseline</i>	<i>p</i> -hidroksibenzoeva k.	354 ± 11,8	46,5 ± 1,54	115 ± 3,82	13,1 ± 0,43	287 ± 9,53	31,3 ± 1,04	112 ± 3,71	17,1 ± 0,57
	2,5-dihidroksibenzoeva k.	33,8 ± 1,45	<LoQ ^b	<LoQ	<LoQ	10,7 ± 0,46	<LoQ	16,0 ± 0,69	<LoQ
	protokatehininska k.	402 ± 18,6	<LoQ	447 ± 20,7	<LoQ	404 ± 18,7	11,3 ± 0,52	91,2 ± 4,22	<LoQ
	<i>p</i> -kumarinska k.	585 ± 19,2	<LoQ	134 ± 4,40	<LoQ	260 ± 8,56	18,9 ± 0,62	173 ± 5,70	<LoQ
	vanilinska k.	465 ± 17,2	65,0 ± 2,40	426 ± 15,7	<LoQ	1116 ± 41,2	52,2 ± 1,93	337 ± 12,4	<LoQ
	galna k.	<LoQ	<LoQ	7,98 ± 0,17	<LoQ	9,41 ± 0,20	<LoQ	<LoQ	<LoQ
	kafena k.	376 ± 11,2	150 ± 4,47	220 ± 6,56	68,8 ± 2,05	236 ± 7,03	403 ± 12,0	175 ± 5,23	50,1 ± 1,49
	ferulna k.	914 ± 38,6	30,0 ± 1,27	769 ± 32,5	30,5 ± 1,29	1377 ± 58,2	57,5 ± 2,43	593 ± 25,1	21,9 ± 0,93
	sinapinska k.	68,5 ± 3,67	<LoQ	30,3 ± 1,63	<LoQ	48,8 ± 2,62	<LoQ	34,8 ± 1,86	<LoQ
	siringinska k.	164 ± 7,95	41,1 ± 1,98	173 ± 8,38	38,1 ± 1,84	463 ± 22,3	58,0 ± 2,80	160 ± 7,72	20,2 ± 0,98
5- <i>O</i> -kafeoilhinska k.	6,99 ± 0,28	<LoQ	<LoQ	<LoQ	13,6 ± 0,55	<LoQ	<LoQ	<LoQ	
<i>Flavonoidi</i>	izoramnetin	2468 ± 60,0	<LoQ	661 ± 16,	<LoQ	762 ± 18,5	<LoQ	230 ± 5,58	<LoQ
	kemferol	280 ± 5,96	<LoQ	48,8 ± 1,04	<LoQ	160 ± 3,41	<LoQ	38,5 ± 0,82	<LoQ
	kemferol-3- <i>O</i> -Glc	1651 ± 28,6	<LoQ	1419 ± 24,6	<LoQ	1978 ± 34,2	12,8 ± 0,22	633 ± 11,0	<LoQ
	hrizoeriol	14,3 ± 0,33	<LoQ	25,4 ± 0,58	<LoQ	17,5 ± 0,40	<LoQ	<LoQ	<LoQ
	luteolin	3,75 ± 0,15	<LoQ	<LoQ	4,98 ± 0,20	5,25 ± 0,21	<LoQ	<LoQ	<LoQ
	luteolin-7- <i>O</i> -Glc	<LoQ	<LoQ	<LoQ	14,7 ± 0,23	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ
	kvercetin	788 ± 28,4	<LoQ	191 ± 6,89	<LoQ	458 ± 16,5	<LoQ	<LoQ	<LoQ
	izokvercitrin	57215 ± 1985	<LoQ	32352 ± 1122	<LoQ	17379 ± 603	279 ± 9,68	10230 ± 355	<LoQ
	rutin	201859 ± 4562	<LoQ	80958 ± 1829	<LoQ	23159 ± 523	526 ± 11,90	28456 ± 643	<LoQ
eskuletin	313 ± 6,31	59,4 ± 1,19	36,5 ± 0,73	20,8 ± 0,42	124 ± 2,50	59,8 ± 1,20	67,6 ± 1,36	10,4 ± 0,21	
sekoizolaricirezinol	46,1 ± 2,09	35,5 ± 1,60	<LoQ	<LoQ	198 ± 8,94	345 ± 15,6	<LoQ	69,4 ± 3,14	
hinska k.	708 ± 25,7	1132 ± 41,1	551 ± 20,0	1050 ± 38,1	642 ± 23,3	999 ± 36,3	742 ± 26,9	1238 ± 44,9	
ukupni sadržaj kvantifikovanih jedinjenja [mg g ⁻¹] ^c	271	1,56	119	1,24	49,8	2,85	41,8	1,43	

^a Rezultati su izraženi kao koncentracija ($\mu\text{g g}^{-1}$ suvog ekstrakta) ± standardna greška ponovljivosti (određena tokom validacije), ^b <LoQ – nije detektovano ili je manje od granice kvantifikacije instrumenta (Orčić i drugi, 2014), ^c suma sadržaja svih detektovanih jedinjenja

Tabela 4.4. Sadržaj ispitivanih fenolnih jedinjenja i hinske kiseline u metanolnim ekstraktima vrste *A. carinatum* sa različitih lokalitata

Koncentracija jedinjenja u ekstraktu ($\mu\text{g g}^{-1}$ suvog ekstrakta) ^a									
Lokalitet	<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i>				<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchelum</i>				
	Čemernik		Tara		Tara		Vlasinsko jezero		
Deo biljke	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	
<i>Fenolne kiseline</i>	<i>p</i> -hidroksibenzoeva k.	107 ± 3,55	<LoQ ^b	88,9 ± 2,95	<LoQ	167 ± 5,53	<LoQ	90,4 ± 3,00	10,6 ± 0,35
	cimetna k.	14,7 ± 0,77	<LoQ	<LoQ	<LoQ	19,9 ± 1,05	<LoQ	<LoQ	<LoQ
	protokatehinska k.	148 ± 6,86	<LoQ	465 ± 21,5	<LoQ	138 ± 6,37	<LoQ	127 ± 5,87	<LoQ
	<i>p</i> -kumarinska k.	168 ± 5,54	<LoQ	460 ± 15,13	<LoQ	277 ± 9,10	<LoQ	168 ± 5,54	<LoQ
	vanilinska k.	88,5 ± 3,26	<LoQ	148 ± 5,46	<LoQ	128 ± 4,72	<LoQ	90,9 ± 3,35	<LoQ
	kafena k.	85,0 ± 2,53	<LoQ	519 ± 15,5	51,4 ± 1,53	95,1 ± 2,83	150 ± 4,47	98,7 ± 2,94	176 ± 5,26
	ferulna k.	310 ± 13,1	13,7 ± 0,58	1089 ± 46,0	16,4 ± 0,70	801 ± 33,9	42,2 ± 1,78	604 ± 25,5	43,5 ± 1,84
	sinapinska k.	<LoQ	<LoQ	20,3 ± 1,09	<LoQ	36,4 ± 1,95	<LoQ	<LoQ	<LoQ
	siringinska k.	72,1 ± 3,48	<LoQ	105 ± 5,06	15,3 ± 0,74	146 ± 7,04	26,4 ± 1,28	42,7 ± 2,06	<LoQ
<i>Flavonoidi</i>	kemferol	31,7 ± 0,67	<LoQ	28,2 ± 0,60	<LoQ	44,0 ± 0,94	<LoQ	67,0 ± 1,43	<LoQ
	kemferol-3- <i>O</i> -Glc	2625 ± 45,4	<LoQ	1263 ± 21,8	<LoQ	5813 ± 101	<LoQ	4963 ± 85,9	<LoQ
	luteolin	3,18 ± 0,13	<LoQ	3,04 ± 0,12	<LoQ	2,97 ± 0,12	<LoQ	3,18 ± 0,13	<LoQ
	luteolin-7- <i>O</i> -Glc	<LoQ	<LoQ	2,25 ± 0,04	<LoQ	23,4 ± 0,37	<LoQ	<LoQ	<LoQ
	kvercetin	<LoQ	<LoQ	67,5 ± 2,44	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ
	izokvercitrin	4481 ± 155	<LoQ	7318 ± 254	<LoQ	1524 ± 52,9	<LoQ	4189 ± 145	<LoQ
	rutin	1752 ± 39,6	<LoQ	5026 ± 114	<LoQ	1261 ± 28,5	<LoQ	1921 ± 43,4	<LoQ
eskuletin	72,3 ± 1,45	<LoQ	178 ± 3,59	19,7 ± 0,40	19,5 ± 0,39	35,2 ± 0,71	56,3 ± 1,13	101 ± 2,02	
sekoizolaricirezinol	<LoQ	<LoQ	42,0 ± 1,90	43,1 ± 1,95	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ	
hinska k.	507 ± 18,4	749 ± 27,2	844 ± 30,6	738 ± 26,8	549 ± 19,9	968 ± 35,1	363 ± 13,2	825 ± 29,9	
ukupni sadržaj kvantifikovanih jedinjenja [mg g^{-1}] ^c	10,05	0,76	18,0	0,88	10,54	1,22	12,54	1,14	

^a Rezultati su izraženi kao koncentracija ($\mu\text{g g}^{-1}$ suvog ekstrakta) ± standardna greška ponovljivosti (određena tokom validacije), ^b <LoQ – nije detektovano ili je manje od granice kvantifikacije instrumenta (Orčić i drugi, 2014), ^c suma sadržaja svih detektovanih jedinjenja

Tabela 4.5. Sadržaj ispitivanih fenolnih jedinjenja i hinske kiseline u metanolnim ekstraktima vrste *A. fuscum* sa različitih lokaliteta

Koncentracija jedinjenja u ekstraktu ($\mu\text{g g}^{-1}$ suvog ekstrakta) ^a									
Lokalitet	<i>A. fuscum subsp. fuscum</i>				<i>A. fuscum subsp. gracile</i>				
	Beli Rzav		Derventa		Zaovine		Tara		
Deo biljke	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	
<i>Fenolne kiseline</i>	<i>p</i> -hidroksibenzoeva k.	48,3 ± 1,61	<LoQ ^b	110 ± 3,65	<LoQ	56,9 ± 1,89	<LoQ	165 ± 5,47	16,3 ± 0,54
	protokatehinska k.	136 ± 6,30	<LoQ	112 ± 5,19	<LoQ	109 ± 5,03	7,04 ± 0,33	132 ± 6,14	<LoQ
	<i>o</i> -kumarinska k.	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ	38,4 ± 1,78
	<i>p</i> -kumarinska k.	333 ± 11,0	15,0 ± 0,49	236 ± 7,77	<LoQ	130 ± 4,29	<LoQ	305 ± 10,0	16,4 ± 0,54
	vanilinska k.	105 ± 3,87	<LoQ	109 ± 4,02	<LoQ	78,8 ± 2,91	<LoQ	153 ± 5,65	<LoQ
	galna k.	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ	7,69 ± 0,16	<LoQ	<LoQ	<LoQ
	kafena k.	101 ± 3,00	46,9 ± 1,40	87,3 ± 2,60	56,8 ± 1,69	107 ± 3,18	51,5 ± 1,53	81,9 ± 2,44	24,3 ± 0,72
	ferulna k.	614 ± 26,0	48,8 ± 2,06	513 ± 21,7	19,6 ± 0,83	304 ± 12,8	52,6 ± 2,23	1262 ± 53,4	48,5 ± 2,05
	sinapinska k.	88,7 ± 4,75	<LoQ	26,8 ± 1,44	<LoQ	65,1 ± 3,49	<LoQ	<LoQ	<LoQ
	siringinska k.	116 ± 5,60	32,1 ± 1,55	54,8 ± 2,65	11,7 ± 0,57	37,4 ± 1,81	50,6 ± 2,44	69,9 ± 3,38	23,3 ± 1,13
<i>Flavonoidi</i>	viteksin	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ	217 ± 6,02	<LoQ	<LoQ	<LoQ
	izoramnetin	37,7 ± 0,92	<LoQ	94,5 ± 2,30	<LoQ	514 ± 12,5	<LoQ	28,5 ± 0,69	<LoQ
	kemferol	15,8 ± 0,34	<LoQ	31,3 ± 0,67	<LoQ	106 ± 2,24	<LoQ	12,8 ± 0,27	<LoQ
	kemferol-3- <i>O</i> -Glc	160 ± 2,76	<LoQ	668 ± 11,5	<LoQ	626 ± 10,8	<LoQ	549 ± 9,51	<LoQ
	luteolin	4,63 ± 0,19	<LoQ	2,17 ± 0,09	<LoQ	4,49 ± 0,18	<LoQ	<LoQ	<LoQ
	luteolin-7- <i>O</i> -Glc	2,74 ± 0,04	<LoQ	<LoQ	<LoQ	2,14 ± 0,03	<LoQ	<LoQ	<LoQ
	kvercetin	<LoQ	<LoQ	93,8 ± 3,38	<LoQ	794 ± 28,6	<LoQ	<LoQ	<LoQ
	izokvercitrin	3264 ± 113	43,8 ± 1,52	4164 ± 144	<LoQ	2017 ± 70,0	20,4 ± 0,71	5180 ± 180	<LoQ
	rutin	36906 ± 834	249 ± 5,63	10514 ± 238	<LoQ	11358 ± 257	<LoQ	30688 ± 693	<LoQ
	eskuletin	42,3 ± 0,85	82,7 ± 1,66	31,5 ± 0,63	12,2 ± 0,24	54,4 ± 1,09	39,3 ± 0,79	61,8 ± 1,24	107 ± 2,16
hinska k.	379 ± 13,7	936 ± 34,0	908 ± 32,9	1208 ± 43,9	1137 ± 41,2	1045 ± 37,9	702 ± 25,5	1598 ± 58,0	
ukupni sadržaj kvantifikovanih jedinjenja [mg g^{-1}] ^c	42,1	1,35	17,13	1,41	17,91	1,26	38,74	1,85	

^a Rezultati su izraženi kao koncentracija ($\mu\text{g g}^{-1}$ suvog ekstrakta) ± standardna greška ponovljivosti (određena tokom validacije), ^b <LoQ – nije detektovano ili je manje od granice kvantifikacije instrumenta (Orčić i drugi, 2014), ^c suma sadržaja svih detektovanih jedinjenja

Tabela 4.6. Sadržaj ispitivanih fenolnih jedinjenja i hinske kiseline u metanolnim ekstraktima vrsta *A. oleraceum*, *A. pallens*, *A. paniculatum* i *A. rhodopeum*

Koncentracija jedinjenja u ekstraktu ($\mu\text{g g}^{-1}$ suvog ekstrakta) ^a									
Lokalitet	<i>A. oleraceum</i>		<i>A. pallens</i>		<i>A. paniculatum</i>		<i>A. rhodopeum</i>		
	Kosmovac		Beli Rzav		Titelski breg		Dimitrovgrad		
Deo biljke	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	
<i>Fenolne kiseline</i>	<i>p</i> -hidroksibenzoeva k.	61,3 ± 2,04	<LoQ ^b	315 ± 10,5	10,1 ± 0,34	244 ± 8,11	16,3 ± 0,54	287 ± 9,52	14,1 ± 0,47
	2,5-dihidroksibenzoeva k.	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ	11,5 ± 0,49	<LoQ	<LoQ	<LoQ
	protokatehinska k.	106 ± 4,92	8,49 ± 0,39	840 ± 38,9	<LoQ	238 ± 11,0	6,63 ± 0,31	138 ± 6,38	<LoQ
	<i>p</i> -kumarinska k.	127 ± 4,18	<LoQ	197 ± 6,47	<LoQ	202 ± 6,64	14,0 ± 0,46	197 ± 6,47	<LoQ
	vanilinska k.	122 ± 4,50	<LoQ	447 ± 16,5	<LoQ	181 ± 6,68	28,6 ± 1,06	505 ± 18,6	<LoQ
	galna k.	<LoQ	<LoQ	10,4 ± 0,22	<LoQ	5,31 ± 0,11	<LoQ	<LoQ	<LoQ
	kafena k.	50,7 ± 1,51	<LoQ	340 ± 10,1	48,3 ± 1,44	310 ± 9,23	245 ± 7,31	132 ± 3,95	46,2 ± 1,38
	ferulna k.	858 ± 36,3	30,7 ± 1,30	441 ± 18,6	31,3 ± 1,32	972 ± 41,1	127 ± 5,37	626 ± 26,5	76,2 ± 3,22
	sinapinska k.	<LoQ	<LoQ	20,0 ± 1,07	<LoQ	17,9 ± 0,96	<LoQ	48,5 ± 2,60	<LoQ
	siringinska k.	93,4 ± 4,51	33,5 ± 1,62	85,2 ± 4,11	<LoQ	140 ± 6,76	33,8 ± 1,63	112 ± 5,43	<LoQ
5- <i>O</i> -kafeoilhinska k.	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ	17,1 ± 0,70	<LoQ	<LoQ	<LoQ	
<i>Flavonoidi</i>	viteksin	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ	11,02 ± 0,31	<LoQ
	izoramnetin	13,5 ± 0,33	<LoQ	26,9 ± 0,65	<LoQ	<LoQ	<LoQ	51,4 ± 1,25	<LoQ
	kemferol	24,8 ± 0,53	<LoQ	31,6 ± 0,67	<LoQ	50,3 ± 1,07	<LoQ	28,8 ± 0,61	<LoQ
	kemferol-3- <i>O</i> -Glc	338 ± 5,85	<LoQ	2880 ± 49,8	<LoQ	597 ± 10,3	39,3 ± 0,68	540 ± 9,34	<LoQ
	kvercetin	<LoQ	<LoQ	149 ± 5,40	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ
	izokvercitrin	5037 ± 178	10,2 ± 0,35	15321 ± 532	4,86 ± 0,17	6758 ± 234	28,6 ± 0,99	3000 ± 104	<LoQ
	hiperozid	1042 ± 16,6	<LoQ	8109 ± 129	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ
	rutin	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ	25373 ± 880	<LoQ	247 ± 5,58	<LoQ
eskuletin	44,6 ± 0,90	9,32 ± 0,19	96,0 ± 1,93	13,5 ± 0,27	193 ± 3,87	83,4 ± 1,68	45,1 ± 0,91	62,4 ± 1,25	
hinska k.	836 ± 30,3	1623 ± 58,9	441 ± 16,0	921 ± 33,4	638 ± 23,2	1058 ± 38,4	689 ± 25,0	749 ± 27,2	
ukupni sadržaj kvantifikovanih jedinjenja [mg g^{-1}] ^c	8,09	1,71	29,58	1,02	35,40	1,66	6,09	0,93	

^a Rezultati su izraženi kao koncentracija ($\mu\text{g g}^{-1}$ suvog ekstrakta) ± standardna greška ponovljivosti (određena tokom validacije), ^b <LoQ – nije detektovano ili je manje od granice kvantifikacije instrumenta (Orčić i drugi, 2014), ^c suma sadržaja svih detektovanih jedinjenja

Tabela 4.7. Sadržaj ispitivanih fenolnih jedinjenja i hinske kiseline u metanolnim ekstraktima vrste *A. melanantherum*

Koncentracija jedinjenja u ekstraktu ($\mu\text{g g}^{-1}$ suvog ekstrakta) ^a						
<i>A. melanantherum</i>						
Lokalitet	Čemernik		Plana, šuma breze		Plana, livada	
Deo biljke	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	nadzemni	
<i>Fenolne kiseline</i>	<i>p</i> -hidroksibenzoeva k.	129 ± 4,27	<LoQ ^b	238 ± 7,91	<LoQ	243 ± 8,06
	cimetna k.	25,4 ± 1,34	<LoQ	46,3 ± 2,44	<LoQ	<0,024
	protokatehinska k.	384 ± 17,8	<LoQ	420 ± 19,4	<LoQ	310 ± 14,35
	<i>p</i> -kumarinska k.	942 ± 31,0	67,8 ± 2,23	1148 ± 37,8	148 ± 4,87	3000 ± 98,7
	vanilinska k.	180 ± 6,65	<LoQ	420 ± 15,5	<LoQ	253 ± 9,35
	galna k.	<LoQ	<LoQ	6,45 ± 0,14	<LoQ	19,53 ± 0,41
	kafena k.	565 ± 16,8	32,0 ± 0,95	730 ± 21,8	68,0 ± 2,03	1504 ± 44,83
	ferulna k.	1488 ± 62,9	70,8 ± 2,99	1827 ± 77,3	182 ± 7,72	3632 ± 153
	siringinska k.	138 ± 6,66	20,6 ± 0,99	207 ± 10,0	20,9 ± 1,01	256 ± 12,4
	5- <i>O</i> -kafeoilhinska k.	10,6 ± 0,43	<LoQ	6,18 ± 0,25	<LoQ	15,71 ± 0,64
	izoramnetin	<LoQ	<LoQ	31,7 ± 0,77	<LoQ	<LoQ
kemferol	56,1 ± 1,20	<LoQ	291 ± 6,21	<LoQ	247 ± 5,27	
kemferol-3- <i>O</i> -Glc	1408 ± 24,4	<LoQ	3714 ± 64,2	<LoQ	2370 ± 41,0	
luteolin	4,15 ± 0,17	<LoQ	43,66 ± 1,76	<LoQ	35,3 ± 1,43	
luteolin-7- <i>O</i> -Glc	<LoQ	<LoQ	2,38 ± 0,04	<LoQ	4,60 ± 0,07	
kvercetin	67,7 ± 2,44	<LoQ	52,5 ± 1,90	<LoQ	<LoQ	
izokvercitrin	1079 ± 37,4	<LoQ	1507 ± 52,3	<LoQ	890 ± 30,9	
hiperozid	54,3 ± 0,86	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ	
rutin	126990 ± 2870	<LoQ	206433 ± 4665	<LoQ	253536 ± 5730	
eskuletin	162 ± 3,26	11,4 ± 0,23	246 ± 4,94	13,9 ± 0,28	389 ± 7,82	
hinska k.	685 ± 24,9	1180 ± 42,8	737 ± 26,7	1154 ± 41,9	970 ± 35,2	
ukupni sadržaj kvantifikovanih jedinjenja [mg g^{-1}] ^c		134	1,38	218	1,59	267

^a Rezultati su izraženi kao koncentracija ($\mu\text{g g}^{-1}$ suvog ekstrakta) ± standardna greška ponovljivosti (određena tokom validacije), ^b <LoQ – nije detektovano ili je manje od granice kvantifikacije instrumenta (Orčić i drugi, 2014), ^c suma sadržaja svih detektovanih jedinjenja

Iz prikazanih rezultata vidi se da je od ukupno 45 ispitivanih jedinjenja, u ekstraktima vrsta roda *Allium* sect. *Codonoprasum* detektovano dvadeset sedam, dok preostalih osamnaest jedinjenja (umbeliferon, skopoletin, 3,4-dihidroksicimetna kiselina, daidzein, bajkalein, bajkalin, genistein, naringenin, epikatehin, katehin, miricetin, mateirezinol, apigenin, apigenin-7-*O*-glukozid, epigalokatehin-galat, apiin, kvercitrin i amentoflavon) nije bilo prisutno ni u jednom ispitivanom uzorku. Ukupan sadržaj kvantifikovanih jedinjenja u ekstraktima nadzemnih delova biljaka kretao se od 6,09–271 mg g^{-1} suvog ekstrakta, odnosno 0,6–27 % suvog ekstrakta. U ekstraktima lukovica, ovaj sadržaj je bio znatno manji i kretao se u rasponu od 0,76–2,85 mg g^{-1} suvog ekstrakta, odnosno od 0,076–0,285 % suvog ekstrakta. Nisu zapažene veće razlike u kvalitativnom sastavu uzoraka istog taksona sa različitim lokaliteta, ali je zato varijabilnost u kvantitativnom sastavu bila veoma izražena u zavisnosti od mesta sakupljanja biljnog materijala, naročito u slučaju vrsta *A. flavum* i *A. melanantherum*.

Fenolne kiseline detektovane su kako u ekstraktima nadzemnih delova biljke, tako i u ekstraktima lukovica, ali u znatno manjoj količini, dok su flavonoidi zastupljeni gotovo isključivo u nadzemnim delovima biljaka. Jedino jedinjenje čija je količina veća u lukovicama nego u nadzemnim delovima biljaka je hinska kiselina, koja nastaje redukcijom 3-dehidrohinske kiseline, ključnog intermedijera u šikimatnom putu biosinteze fenolnih kiselina (Dewick, 2009). Hinska kiselina je jedan od prekursora u biosintezi hlorogenskih kiselina (5-*O*-4-kumaroilhinske, 5-*O*-kafeoilhinske, 5-*O*-feruloilhinske) (Koshiro i drugi, 2007), pa bi se moglo očekivati da ispitivane

Allium vrste sadrže i ovu vrstu jedinjenja. Međutim, 5-*O*-kafeoilhinska kiselina, iako detektovana u vrstama sect. *Codonoprasum*, bila je prisutna samo u izuzetno malim koncentracijama (0,89–17,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ s. e.). Prema literaturnim podacima 5-*O*-kafeoilhinska kiselina zastupljena je u vrstama *A. cepa*, *A. pskemense*, *A. galantum* i *A. fistulosum* (Runkova i Talieva, 1970), kao i u nadzemnim delovima i korenu belog luka (Tuan i drugi, 2010).

U cilju lakšeg uočavanja jedinjenja bitnih za diferenciranje između vrsta (hemotaksonomskih markera), primenjene su tehnike multivarijantne analize (eng. *multivariate analysis*), tačnije analiza glavnih komponenti (eng. *principal component analysis*, PCA) i diskriminantna analiza (eng. *discriminant / hotelling analysis*). PCA je matematički postupak koji transformiše veliki broj potencijalno korelisanih originalnih promenljivih u skup novih linearno nekorelisanih promenljivih koje se zovu glavne komponente (PC). Linearna kombinacija sa najvećom mogućom varijabilnošću (varijansom) između podataka predstavlja prvu glavnu komponentu. Svaku sledeću glavnu komponentu karakteriše najveća moguća varijansa između podataka uz uslov da je ova komponenta ortogonalna na prethodnu glavnu komponentu, tj. da nije sa njom u korelaciji. Glavne komponente su poredane tako da prvih nekoliko komponenata obuhvata većinu varijacija prisutnih u svim originalnim promenljivim (Jolliffe, 2002).

Analizom glavnih komponenti obuhvaćeni su podaci o sadržaju derivata kvercetina i sadržaju fenolnih kiselina. Podaci za ekstrakte nadzemnih delova analizirani su zasebno od podataka za ekstrakte lukovica. Korišćeni su neobrađeni podaci za koncentraciju jedinjenja ($\mu\text{g/g}$ s. e.) ili normalizovani rezultati u slučaju derivata kvercetina (zbog izrazito visoke koncentracije rutina izvršeno relativno skaliranje u okviru pojedinačnih varijabli na skalu od 100, tako što je najveća vrednost u okviru jedne varijable proglašena za 100).

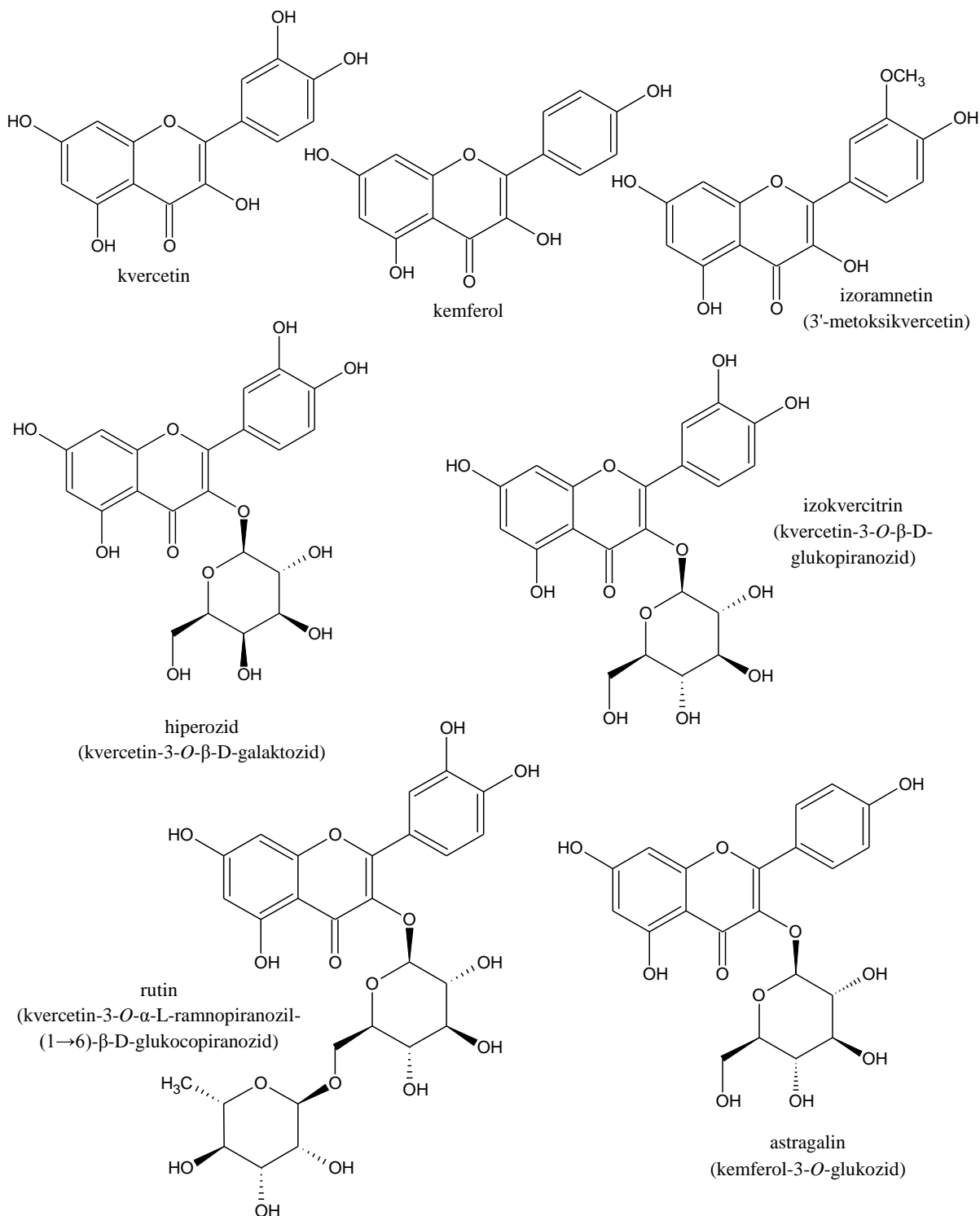
Radi bolje preglednosti na dijagramima, svakom ekstraktu dodeljena je odgovarajuća oznaka (Tabela 4.8.).

Tabela 4.8. Oznake ekstrakata korišćene u PCA analizi

Vrsta	Lokalitet	Nadzemi deo	Lukovica
		Oznaka	Oznaka
<i>A. flavum</i>	Dimitrovgrad	FH-1	FL-1
	Babušnica	FH-2	FL-2
	Klisura Jerme	FH-3	FL-3
	Vršački breg	FH-4	FL-4
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i>	Čemernik	CCH-1	CCL-1
	Tara	CCH-2	CCL-2
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchelum</i>	Tara	CPH-1	CPL-1
	Vlasinsko jezero	CPH-2	CPL-2
<i>A. oleraceum</i>	Kosmovac	OH-1	OL-1
<i>A. pallens</i>	Beli Rzav	PH-1	PL-1
<i>A. melanantherum</i>	Čemernik	MH-1	MH-1
	Plana	MH-2	MH-2
	Plana druga strana	MH-3	-
<i>A. fuscum</i> subsp. <i>fuscum</i>	Beli Rzav	FFH-1	FFL-1
	Derventa	FFH-2	FFL-2
	Zaovine	FFH-3	FFL-3
<i>A. fuscum</i> subsp. <i>gracile</i>	Tara	FGH-1	FGL-1
<i>A. paniculatum</i> subsp. <i>marginatum</i>	Titelski breg	PTH-1	PTL-1
<i>A. rhodopeum</i>	Dimitrovgrad	RH-1	RL-1

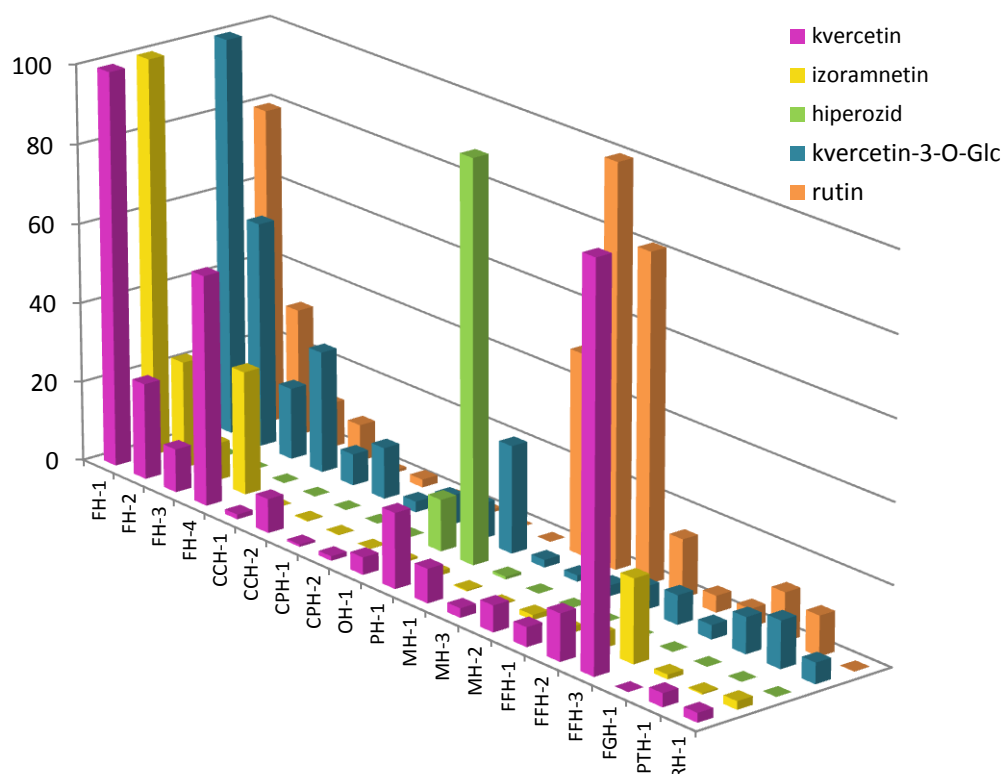
Najdominantnija flavonoidna jedinjenja u ispitivanim vrstama sect. *Codonoprasum* su glikozidi kvercetina (rutin, hiperozid, izokvercitrin, izoramnetin), kao i kemferol-3-*O*-glukozid (astragalin) (Slika 4.6.). Izokvercitrin i astragalin prisutni su u visokoj količini u ekstraktima nadzemnih delova biljaka svih ispitivanih taksona (0,89–57,2 mg g^{-1} i 0,16–5,81 mg g^{-1} ,

respektivno). Rutin je najdominantniji flavonoid u nadzemnim delovima ispitivanih vrsta, osim u slučaju vrsta *A. oleraceum* i *A. pallens*, u čijim ekstraktima ovo jedinjenje uopšte nije detektovano, i vrste *A. rhodopeum*, koja sadrži malu količinu ovog flavonoida. Aglikoni kvercetin, kemferol i izoramnetin prisutni su u većini ispitivanih vrsta, ali u vrlo maloj količini.



Slika 4.6. Hemijske strukture flavonoida detektovanih u metanolnim ekstraktima ispitivanih vrsta roda *Allium* sect. *Codonoprasum*

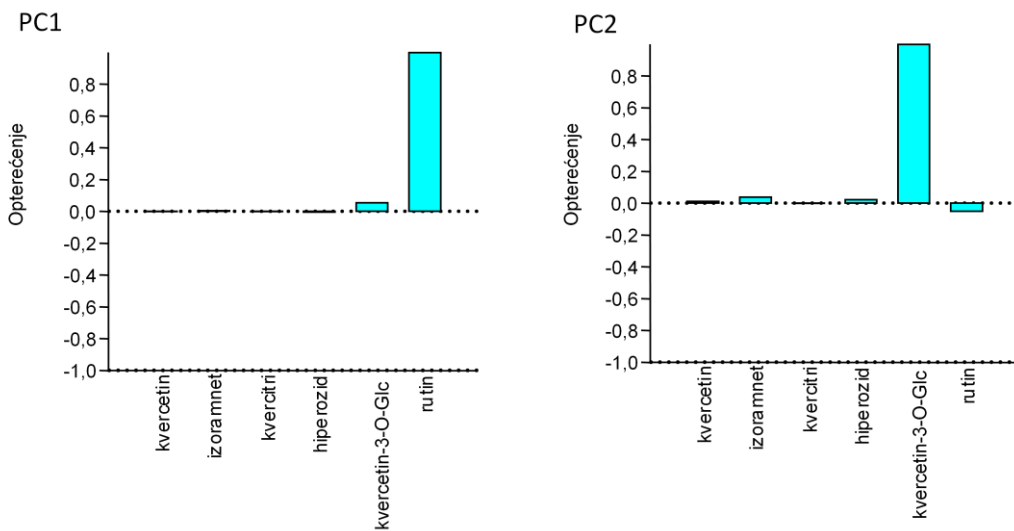
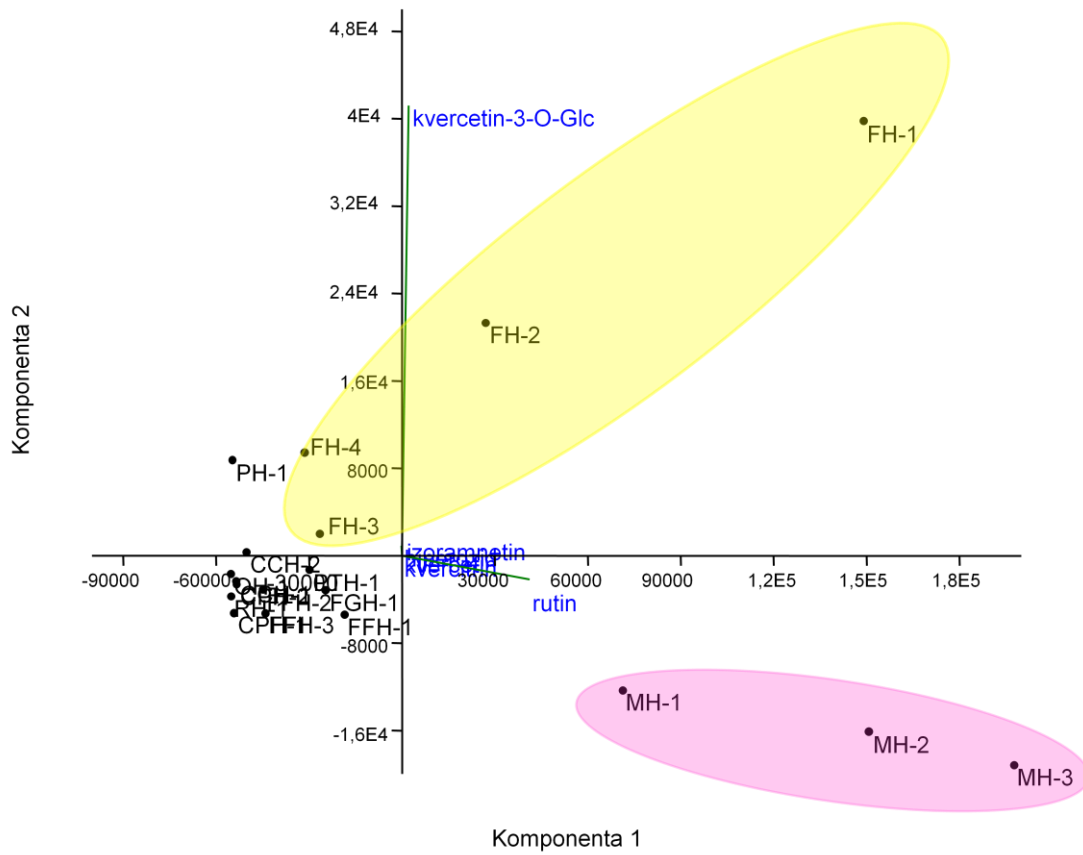
Raspodela derivata kvercetina u ekstraktima nadzemnih delova biljaka prikazana je na Slici 4.7. Da bi se bolje uočile razlike u zastupljenosti pojedinih flavonoida između vrsta sect. *Codonoprasum*, sadržaj flavonoida u ekstraktima nadzemnih delova biljaka je u okviru pojedinačnih varijabli skaliran na skalu od 100, tako što je najveća vrednost u okviru jedne varijable proglašena za 100. Iz dijagrama sa slike se vidi da se kvercetin javlja u nadzemnim delovima skoro svih ispitivanih vrsta, sa najvećim sadržajem u taksonima *A. flavum*, *A. fuscum* var. *fuscum* i *A. pallens*, izoramnetin je najviše zastupljen u taksonima *A. flavum* i *A. fuscum* var. *fuscum*, dok je hiperozid karakterističan za vrste *A. oleraceum* i *A. pallens*. Kvercetin-3-O-glukozid (izokvercitrin) je takođe prisutan u svim ispitivanim vrstama, a najveća količina ovog jedinjenja nađena je u vrsti *A. flavum*.



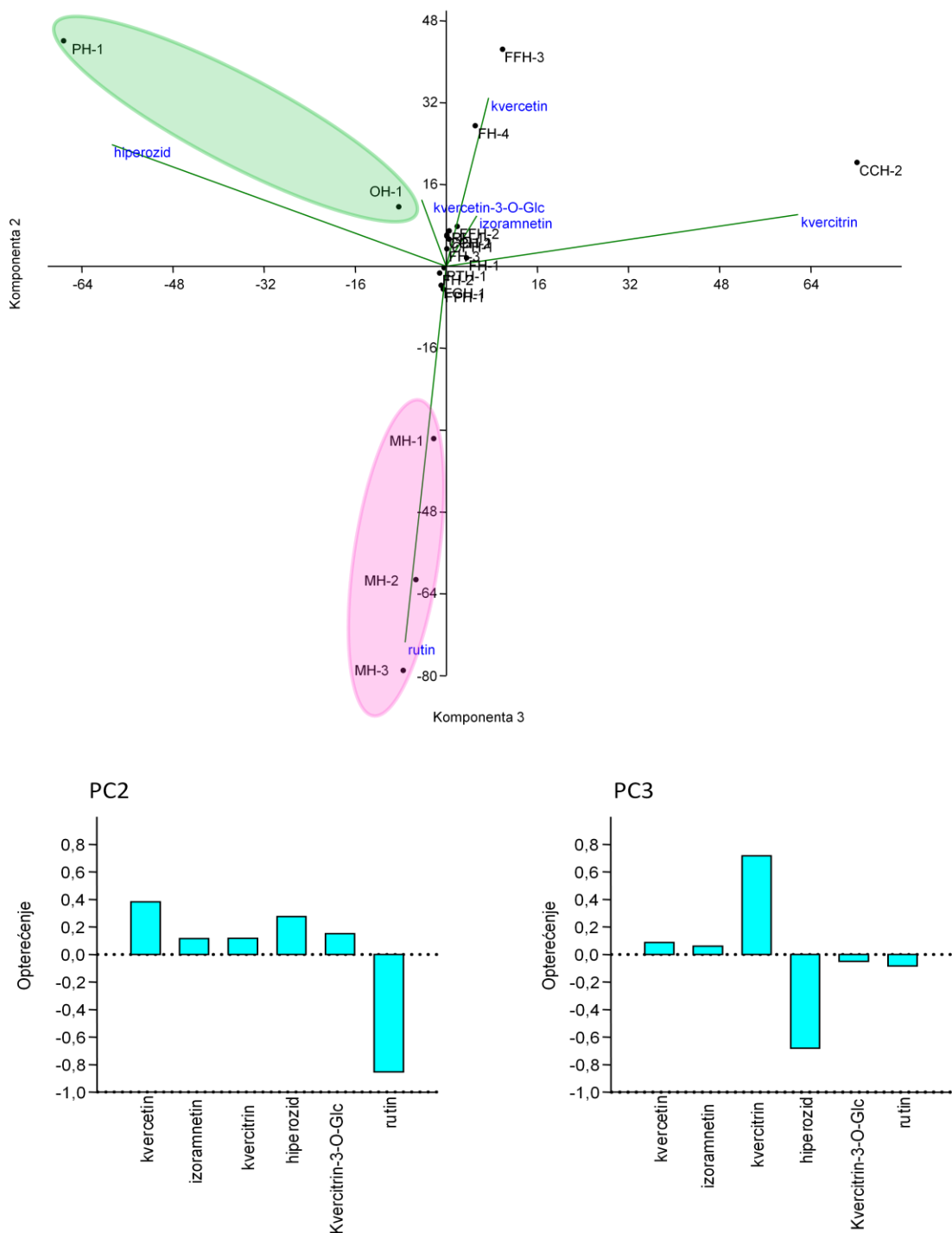
Slika 4.7. Zastupljenost derivata kvercetina u ekstraktima nadzemnih delova biljaka. Vrednosti za sadržaj flavonoida (y-osa) skalirane na skalu od 100, tako što je najveća vrednost u okviru jedne varijable proglašena za 100

Rezultati PCA analize sadržaja derivata kvercetina prikazani su na Slici 4.8. (*biplot* i grafici opterećenja) i u Prilogu 8.4. (*Slika 8.40.* i *Tabele 8.10* i *8.11.*). Prva glavna komponenta (PC1), koja opisuje 97,4% varijanse, diferencira vrste prvenstveno na osnovu sadržaja rutina, dok kvercetin-3-O-glukozid nosi najveće opterećenje na drugoj glavnoj komponenti (PC2). Sa *biplot*-a se vidi da se vrsta *A. melanatherum* od ostalih odvaja prvenstveno na osnovu visokog sadržaja rutina i niskog sadržaja kvercetin-3-O-glukozida, dok vrstu *A. flavum* od ostalih odvajaju visoki sadržaji rutina i kvercetin-3-O-glukozida.

Ako se PCA analiza izvrši na rezultatima za sadržaj derivata kvercetina skaliranim na skalu od 100 u okviru pojedinačnih varijabli (*Slika 4.9.* – *biplot* i grafici opterećenja, *Prilog 8.4.* – *Slika 8.41.* i *Tabele 8.12* i *8.13.*), uočava se da se vrste *A. pallens* i *A. oleraceum* jedine grupišu u levom kvadrantu *biplot*-a druge i treće glavne komponente, jer za razliku od ostalih vrsta ne sadrže rutin, a sadrže znatnu količinu hiperozida. Ova karakteristika flavonoidnog profila vrsta *A. pallens* i *A. oleraceum* bi mogla biti od značaja sa hemotaksonomskog aspekta.



Slika 4.8. PCA detektovanih derivata kvercetina u ekstraktima nadzemnih delova ispitivanih vrsta (gore – biplot za PC1 vs. PC2, dole – grafici opterećenja za prvu i drugu glavnu komponentu (PC1 i PC2))



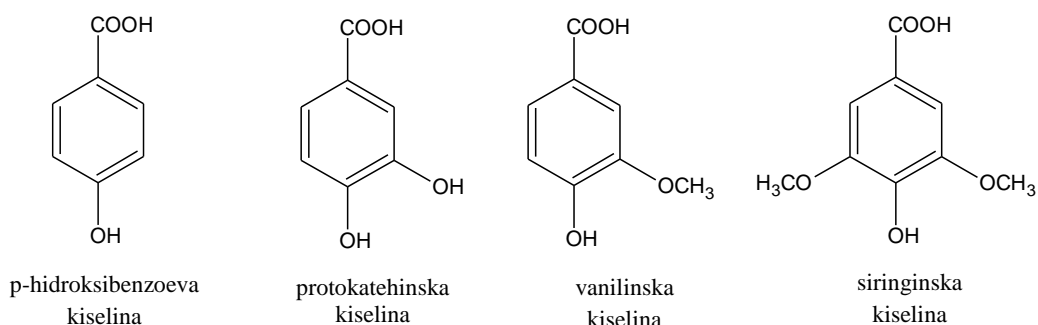
Slika 4.9. PCA detektovanih derivata kvercetina u ekstraktima nadzemnih delova ispitivanih vrsta (gore – biplot za PC2 vs. PC3, dole – grafici opterećenja za drugu i treću glavnu komponentu (PC1 i PC2)); rezultati normalizovani na najveću količinu datog jedinjenja kao 100%

Prisustvo derivata kvercetina karakteristično je i za druge vrste lukova. Tako kvercetin-3,4'-O-diglukozid i kvercetin-4'-O-glukozida čine oko 85% od ukupnog sadržaja flavonoida crnog luka, dok u sastav ostalih 15% ulaze izokvercitrin, aglikon kvercetin i izoramnetin-glukozid (Price i Rhodes, 1997; Park i Lee, 1996). Najveća razlika u odnosu na crni luk je prisustvo astragalina u vrstama sect. *Codonoprasum*, kao i izrazito veliki sadržaj rutina u većini vrsta ove sekcije. U belom

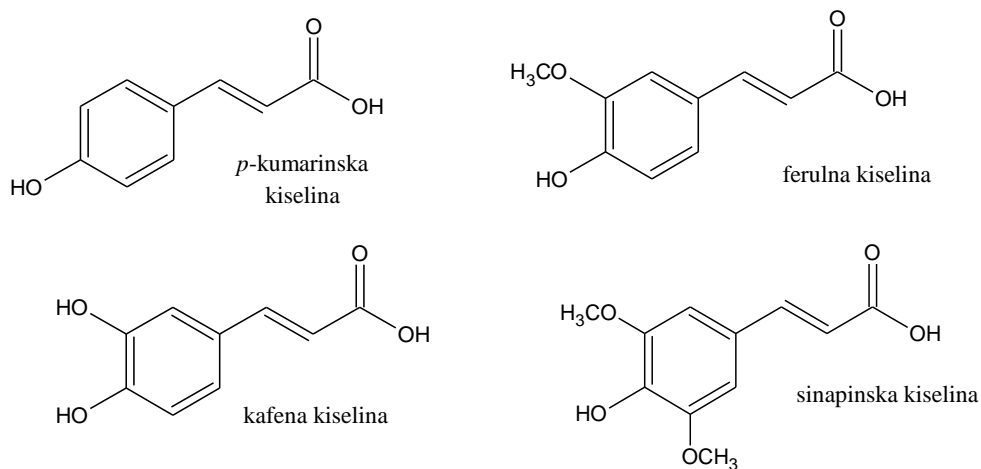
luku, za razliku od crnog luka, dominiraju slobodni flavonski aglikoni – miricetin i apigenin (Miean i Mohamed, 2001; Azzini i drugi, 2014), koji nisu nađeni u vrstama sect. *Codonoprasum*. Međutim, kvercetin, rutin i kemferol, koji su prisutni u belom luku u maloj količini (Božin, 2009; Gorinstein i drugi, 2008), detektovani su u ovom radu i u vrstama sect. *Codonoprasum*. Pored toga, u listovima i izdanacima belog luka prisutni su astragalini i izokvercitrin, koji se takođe nalaze u nadzemnim delovima predstavnika sect. *Codonoprasum*.

Sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktima nadzemnih delova vrsta sect. *Codonoprasum* je znatno manji u odnosu na sadržaj flavonoida. Fenilpropenske kiseline (ferulna, p-kumarinska, kafena i sinapinska) i četiri derivata benzojeve kiseline (*p*-hidroksibenzojeva, protokatehinska, vanilinska i siringinska) prisutne su u svim vrstama (Slika 4.10.).

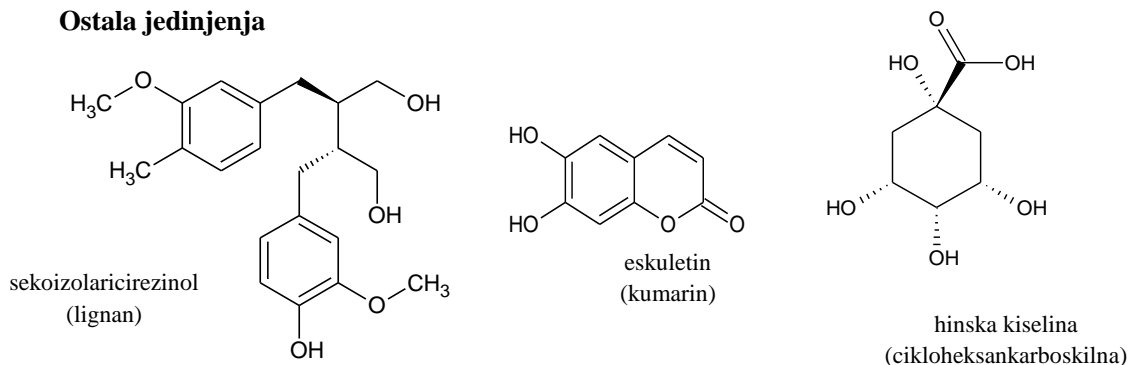
Derivati benzojeve kiseline



Fenilpropenske kiseline

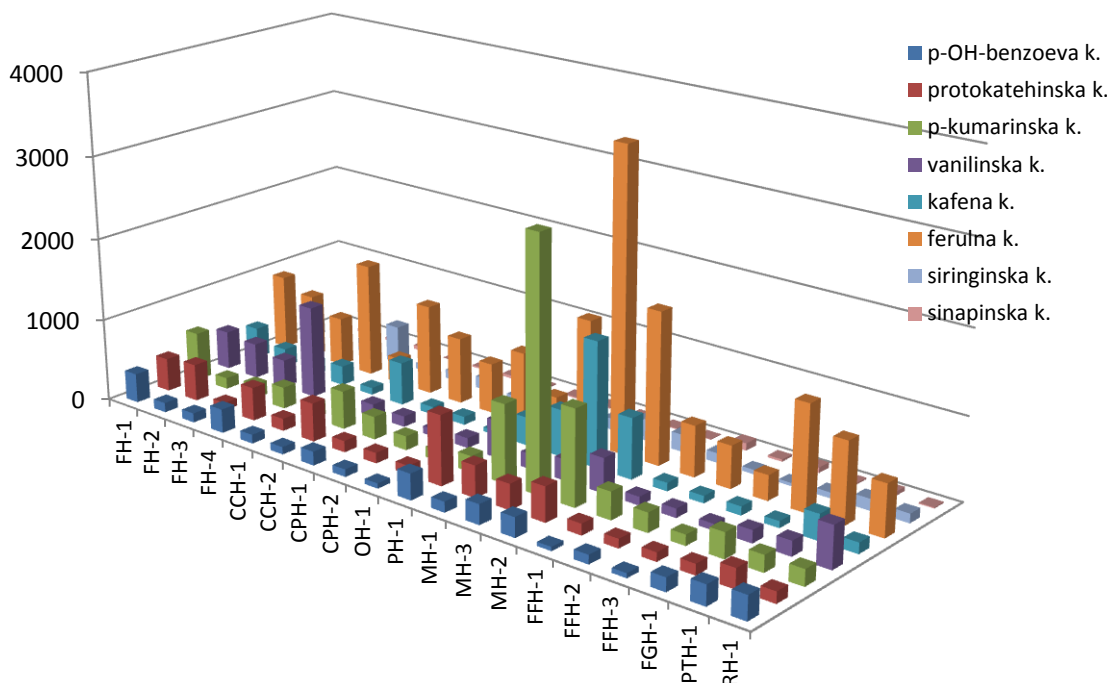


Ostala jedinjenja

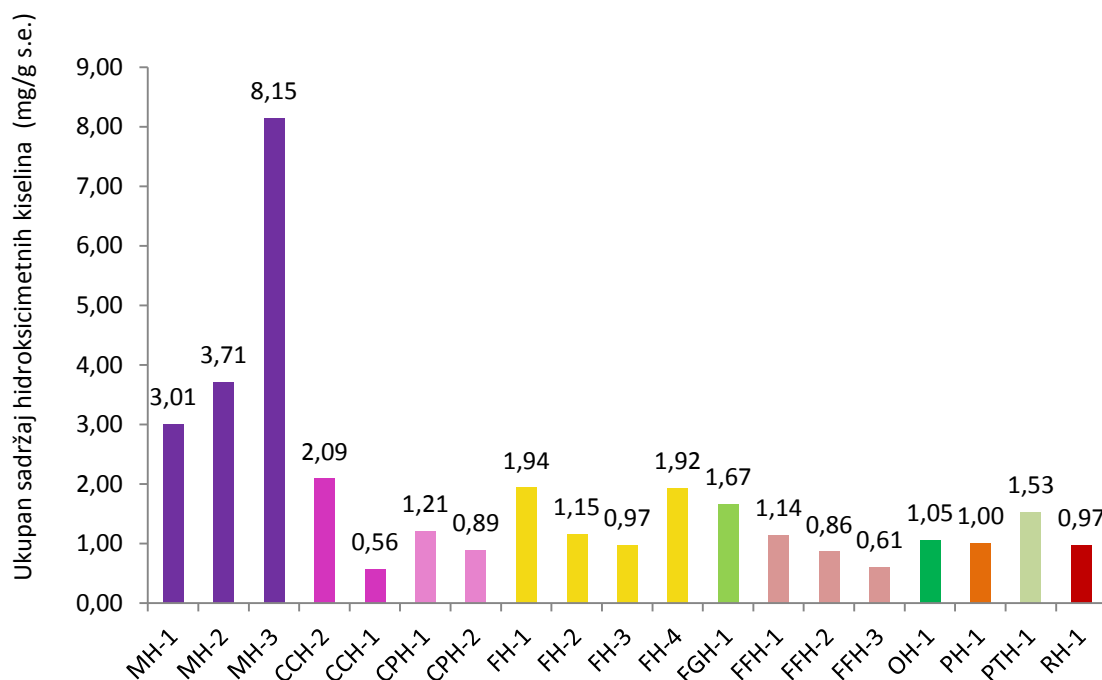


Slika 4.10. Hemijska struktura hinjske kiseline i fenolnih jedinjenja detektovanih u metanolnim ekstraktima ispitivanih vrsta roda *Allium* sect. *Codonoprasum*

Raspodela fenolnih kiselina u ekstraktima nadzemnih delova biljaka prikazana je na *Slici 4.11*. Najzastupljenije su ferulna i *p*-kumarinska kiselina, a zatim kafena i protokatehinska kiselina. Vrsta *A. melanantherum* sadrži najveću količinu fenolnih kiselina, sa velikim udelom fenilpropenskih kiselina (*Slike 4.12*). Kod ostalih vrsta, fenolne kiseline su prisutne u manjoj količini i ravnomerno su raspoređene.

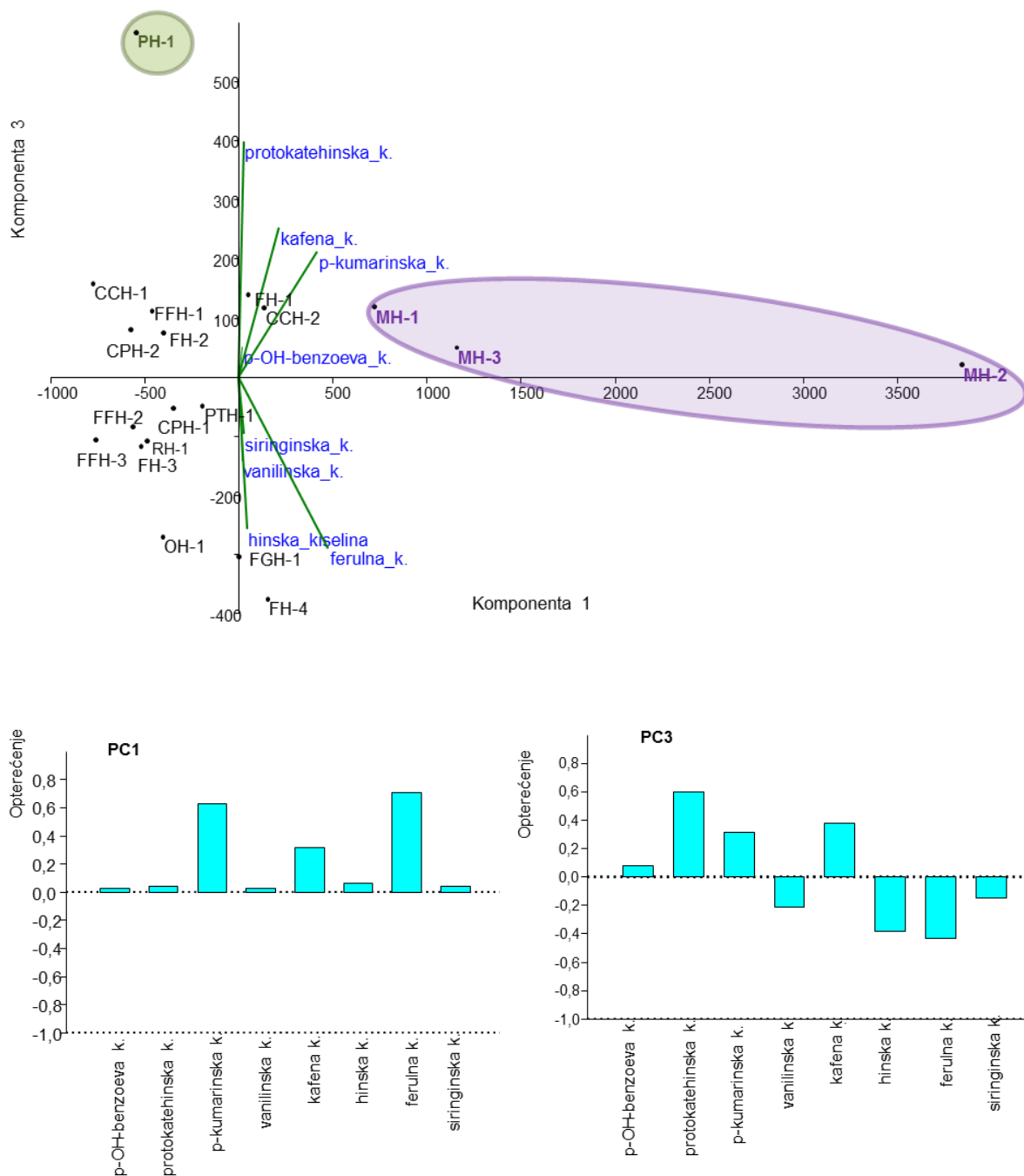


Slika 4.11. Raspodela fenolnih kiselina u ekstraktima nadzemnih delova ispitivanih vrsta



Slika 4.12. Ukupan sadržaj hidroksicimetnih kiselina (*p*-kumarinske, kafene, ferulne i sinapinske) u ekstraktima nadzemnih delova ispitivanih vrsta

Odvajanje vrste *A. melanantherum* (MH-1, MH-2 i MH-3) od ostalih vrsta na osnovu sadržaja p-kumarinske i ferulne kiseline zapaža se i na *biplot*-u dobijenom PCA analizom na *Slici 4.13*. Pored toga, uočava se i odvajanje vrste *A. pallens* (PH-1) na osnovu visokog sadržaja protokatehinske kiseline (*Slika 4.13*). Kumarin eskuletin i fenilpropanoidni lignan sekoizolaricirezinol prisutni su u maloj količini u svim ispitivanim vrstama (*Slika 4.10*).



Slika 4.13. PCA detektovanih fenolnih kiselina u ekstraktima nadzemnih delova ispitivanih vrsta (gore – biplot za PC1 vs. PC3, dole – grafici opterećenja za prvu i treću glavnu komponentu (PC1 i PC3))

Na osnovu rezultata kvantitativne analize fenolnih jedinjenja dobijenih u ovom radu može se zaključiti da vrste sekcije *Codonoprasum* karakteriše prisustvo flavonoidnih glikozida izokvercitrina i astragalina, kao i ferulne, p-kumarinske, vanilinske i protokatehinske kiseline.

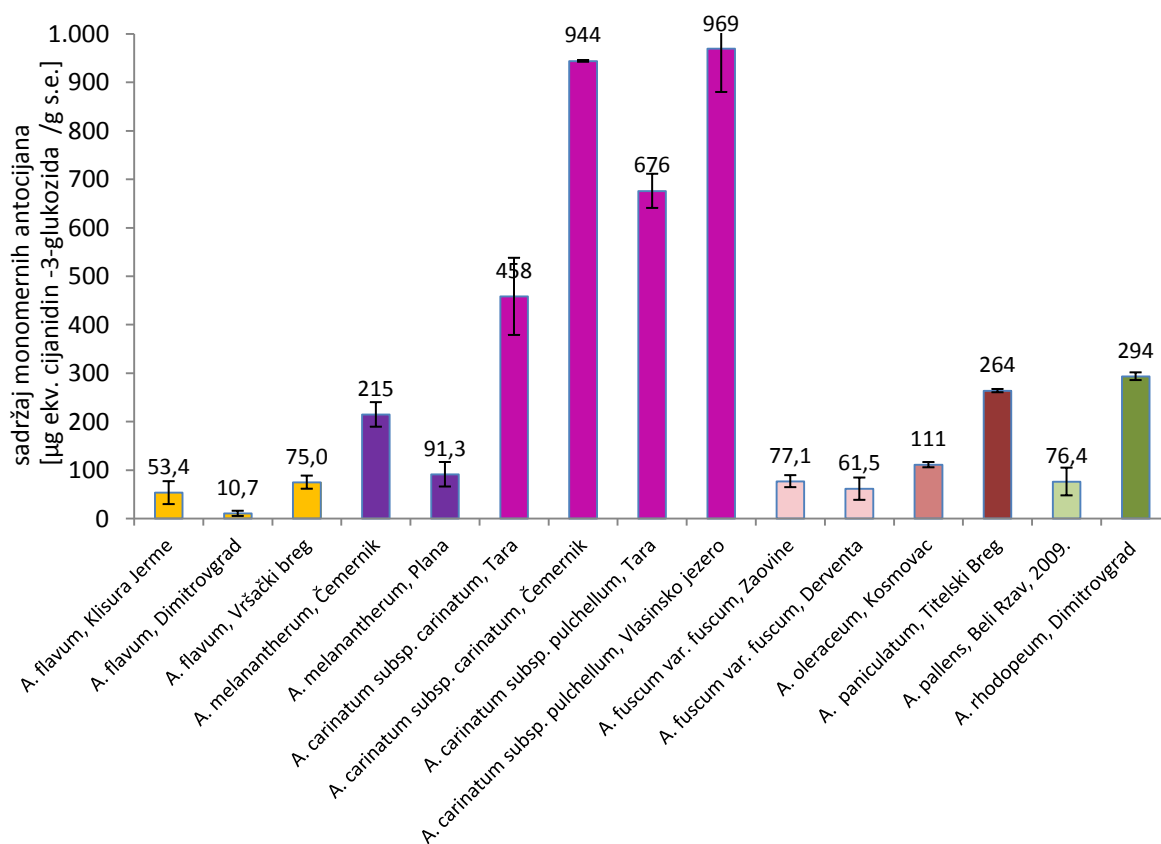
Takođe, sve vrste ove sekcije, izuzev vrsta *A. oleraceum*, *A. pallens* i *A. rhodopeum*, predstavljaju veoma bogate izvore rutina.

4.1.5 Sadržaj ukupnih monomernih antocijana

U ranijim istraživanjima je dokazano da su pojedini varijeteti crnog luka, naročito var. Tropea, veoma bogati antocijanima, naročito derivatima cijanidina, delfinidina i petunidina (Ferrerres i drugi, 1996; Fosen i drugi, 1996; Gennaro i drugi, 2002; Slimestad i drugi, 2007). Pored u *A. cepa*, prisustvo cijanidinskih glikozida dokazano je i u *A. sativum*, *A. altaicum*, *A. schoenoprasum* (vlašac), *A. aschersonianum*, *A. vineale* i *A. victorialis* (Fosen i drugi, 1996; Andersen i Fossen, 1995; Fossen i Andersen, 1997). O prisustvu antocijana u vrstama sect. *Codonoprasum* do sada nije bilo literaturnih podataka.

Sadržaj ukupnih monomernih antocijana u ekstraktima cvasti ispitivanih vrsta sect. *Codonoprasum* određen je po zvaničnoj AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) metodi, koja se zasniva na osobini antocijana da pri promeni pH vrednosti sredine reverzibilno menjaju svoju strukturu, pri čemu dolazi i do promene boje rastvora. Polimerni antocijani ne menjaju boju prilikom promene pH jer apsorbuju na pH=4,5 isto kao i na pH=1, pa se ne mogu odrediti ovom metodom. Sadržaj monomernih antocijana izražen je u ekvivalentima cijanidin-3-glukozida.

Rezultati određivanja ukupnih monomernih antocijana prikazani su u Prilogu 8.5 (Tabele 8.14.–8.16.), a uporedni prikaz dobijenih sadržaja antocijana u ispitivanim vrstama dat je na Slici 4.14.



Slika 4.14. Uporedni prikaz sadržaja ukupnih monomernih antocijana u vrstama roda *Allium* sect. *Codonoprasum*

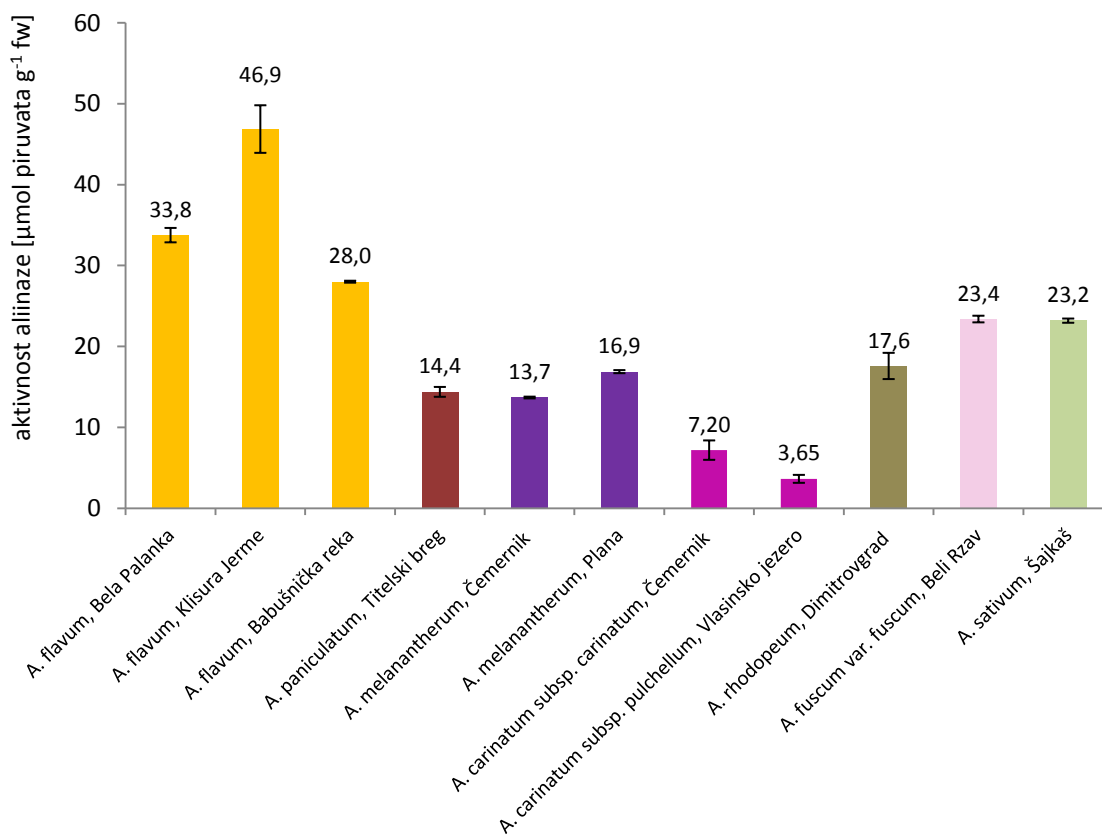
Najviši sadržaj antocijana nađen je u obe podvrste *A. carinatum* (*A. carinatum* subsp. *carinatum* i *A. carinatum* subsp. *pulchellum*) (458–969 μg ekv. cijanidin-3-glukozida g^{-1} suvog ekstrakta), što je bilo za očekivati s obzirom na izrazito ružičastu boju cvasti ovih biljaka. Vrste *A. rhodopeum*, *A. paniculatum* i *A. melanantherum* takođe sadrže znatnu količinu antocijana (91,3–294 μg ekv. cijanidin-3-glukozida g^{-1} suvog ekstrakta), dok vrsta *A. flavum* ima najniži sadržaj ovih jedinjenja (10,7–75,0 μg ekv. cijanidin-3-glukozida g^{-1} suvog ekstrakta). Poređenjem istih vrsta sa različitim lokaliteta vidi se da količina antocijana u biljci varira u zavisnosti od lokaliteta.

4.1.6 Aktivnost aliinaze

Enzimi iz grupe aliinaza nalaze se u većini, ako ne i u svim vrstama roda *Allium* (Brewster i Rabinowich, 1990). Ovi enzimi katalizuju transformaciju različitih *S*-alk(en)il-L-cistein sulfoksida do aromatičnih produkata. Kako su ovi aromatični produkti odgovorni za miris i ukus lukova, aktivnost aliinaze se često koristi kao merilo jačine arome luka.

Aliinaza je smeštena u vakuolama i tek kada se gnječenjem, seckanjem ili žvakanjem luka naruše ćelijske membrane, dolazi do njenog oslobađanja i aktivacije. Aktivnost aliinaze je u ovom radu određena merenjem koncentracije piruvata, jednog od produkata reakcije katalizovane ovim enzimom. Koncentracija piruvata proporcionalna je aktivnosti aliinaze. Rezultat je izražen u μmol piruvata po gramu sveže lukovice (μmol piruvata g^{-1} fw).

Rezultati određivanja aktivnosti aliinaze prikazani su u *Prilogu 8.6* (Tabele 8.17. i 8.18. i *Grafik 8.1.*), a uporedni prikaz aktivnosti aliinaze u ispitivanim vrstama dat je na *Slici 4.15.*



Slika 4.15. Uporedni prikaz aktivnosti aliinaze u ispitivanim vrstama roda *Allium*

Iz prikazanih rezultata vidi se da je enzim aliinaza u svim ispitivanim vrstama veoma aktivan, pri čemu je najviša aktivnost zabeležena u vrsti *A. flavum* (28,0–46,9 μmol piruvata g^{-1} fw), a najniža u dvema podvrstama vrste *A. carinatum* (3,65 μmol piruvata g^{-1} fw u podvrsti *pulchellum* i 7,20 μmol piruvata g^{-1} fw u podvrsti *carinatum*).

Poređenjem dobijenih rezultata za vrste sekcije *Codonoprasum* sa rezultatom dobijenim za beli luk gajen u Vojvodini (lokalitet Šajkaš), zapaža se da je aktivnost aliinaze u vrsti *A. flavum* sa svih ispitivanih lokaliteta (28,0–46,9 μmol piruvata g^{-1} fw) veća u odnosu na beli luk (23,2 μmol piruvata g^{-1} fw). Međutim, u nekim ranijim istraživanjima utvrđena je jako velika varijabilnost u aktivnosti alinaze kod uzoraka belog luka sa različitih lokaliteta (od 7,6 μmol g^{-1} do 78,4 μmol g^{-1}) (Grégrová i drugi, 2013), zbog čega se zapravo ne može izvršiti tačno poređenje sa ovom vrstom. Sa druge strane, ako se aktivnost alinaze vrsta ispitivanih u ovom radu uporedi sa ranije objavljenim rezultatima za crni luk (3,5–7 μmol piruvata g^{-1} sveže lukovice (Wall i Corgan, 1992)), može se zaključiti da je aktivnost aliinaze u većini vrsta sect. *Codonoprasum* veća nego u crnom luku.

Iz rezultata dobijenih za vrstu *A. flavum*, takođe se vidi da aktivnost aliinaze znatno varira u zavisnosti od lokaliteta sa koga je sakupljen uzorak.

4.2 ANTIOKSIDANTNA AKTIVNOST EKSTRAKATA

Danas je poznato da reaktivne hemijske vrste (RS), naročito reaktivne kiseonične (ROS) i azotne (RNS) vrste, usled interakcija sa osnovnim ćelijskim strukturama i biomolekulima, mogu da ispolje brojne štetne efekte u organizmu (Kohno, 2010). ROS mogu da indukuju oksidativnu degradaciju nezasićenih masnih kiselina (lipidnu peroksidaciju), kao i oksidaciju proteina i nukleinskih kiselina, što za posledicu ima razvoj degenerativnih, inflamatornih i kancerogenih obolenja. Delovanjem endogenih antioksidantnih sistema, koji su prisutni u skoro svim ćelijama, oštećenja ćelija i biomolekula se svode na minimum. Međutim, u slučaju kada koncentracija RS nadmaši kapacitet antioksidantne zaštite organizma, potrebno je unositi dodane egzogene antioksidanse, kako bi se izbegli neželjeni efekti.

Egzogene supstance sa antioksidantnim delovanjem mogu biti unete u organizam putem hrane ili putem dijetetskih suplemenata i lekova. Biljke predstavljaju jedan od najvažnijih izvora prirodnih antioksidanasa. Za mnoge biomolekule izolovane iz biljaka (biljni fenoli, jedinjenja azota, jedinjenja sumpora, karotenoidi) dokazano je snažno antioksidantno delovanje. Biljni fenoli, zahvaljujući svojoj osobini da lako doniraju vodonikov atom, uklanjaju slobodne radikale, uz formiranje manje reaktivnih fenoksil radikala. Ova jedinjenja takođe mogu inhibirati oksidativne enzime ili helirati jone prelaznih metala, sprečavajući njihovo katalitičko delovanje u produkciji ROS. Sumporna jedinjenja biljaka deluju kao redukujući agensi doniranjem elektrona sa sumporovog atoma i reakcijom sa slobodnim radikalima, pri čemu ih prevode u stabilnije produkte i na taj način zaustavljaju lančanu slobodnoradikalnu reakciju.

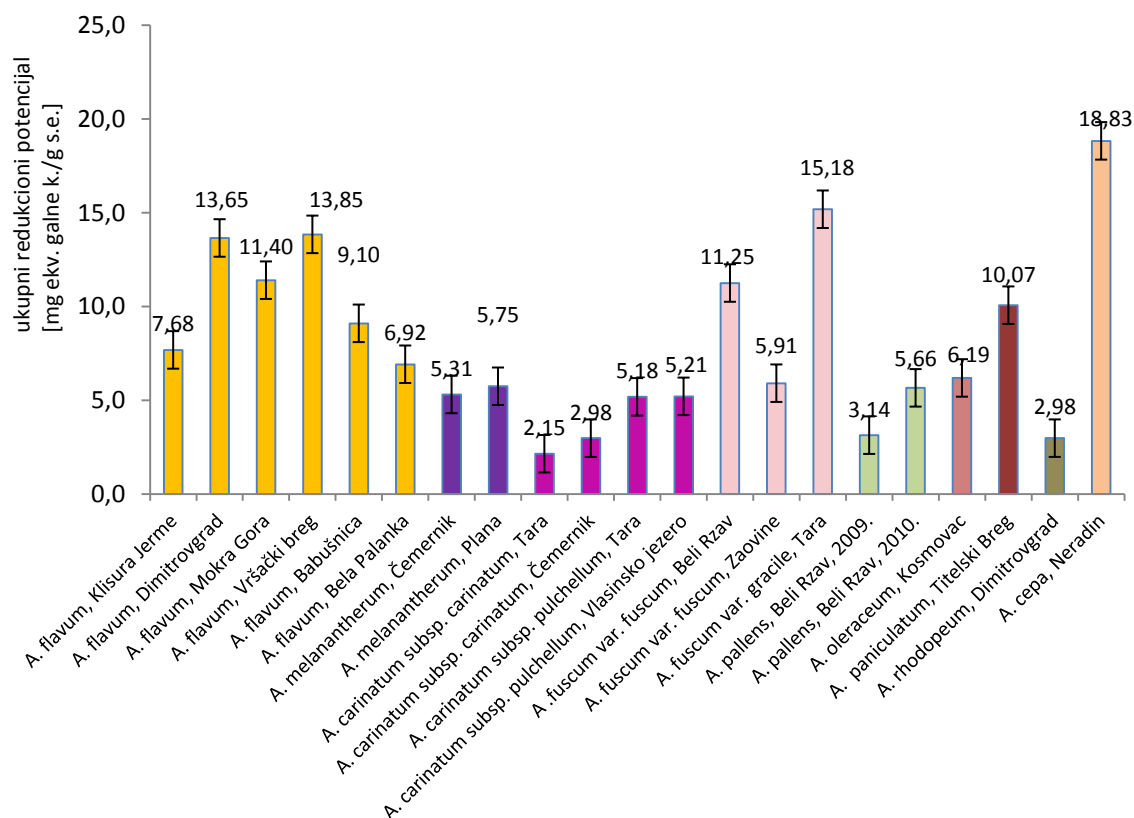
S obzirom da neki antioksidansi u velikoj koncentraciji i pod određenim uslovima mogu da deluju prooksidantno i kancerogeno, pokazalo se da unošenje u organizam velike količine jednog antioksidansa nije korisno, već čak može biti i štetno. Mnogo bolji zaštitni efekat na organizam ima unošenje raznovrsnih antioksidanasa sa različitim mehanizmima delovanja, između kojih se javlja aditivni ili sinergistički efekat. Zbog toga postoji stalni interes za ispitivanjem do sada neispitanih biljnih ekstrakata, koji predstavljaju kompleksne smeše velikog broja potencijalnih antioksidanasa (Liu, 2004; Sakamoto, 2000).

Brojna *in vitro* i *in vivo* ispitivanja belog i crnog luka potvrdila su njihov izuzetan antioksidantni potencijal, koji se ogleda u sposobnosti hvatanja ROS, sposobnosti heliranja jona prelaznih metala, povećanju aktivnosti antioksidantnih enzima (superoksid-dizmutaze, katalaze i glutation-peroksidaze, glutation-S-transferaze i glutation-reduktaze), povećanju količine redukovanog glutationa, inhibiciji lipidne peroksidacije i inhibiciji oksidacije LDL-holesterola (Lawson, 1998; Lanzotti, 2006; Gedik i drugi, 2005; Nishimura i drugi, 2004; Yang i drugi, 2004). U slučaju belog luka antioksidantna aktivnost se uglavnom pripisuje sumpornim jedinjenjima, dok su kod crnog luka za antioksidantnu aktivnost najzaslužnija fenolna jedinjenja (Kim i drugi, 1997; Ide i drugi, 1996; Nishimura i drugi, 2004; Yin i drugi, 2002; Gorinstein, 2008; Kaur i drugi, 2009). Pored crnog i belog luka značajnu antioksidantnu aktivnost *in vitro* pokazali su i ekstrakti i etarska ulja nekih samoniklih lukova (Jedelská, 2007; Božin i drugi, 2009; Tepe i drugi, 2005).

Od svih vrsta sekcije *Codonoprasum*, sa aspekta antioksidantnog delovanja do sada su delimično ispitane samo vrste *A. flavum* i *A. oleraceum*. Curcic i saradnici (2012) pokazali su da acetonski, etil-acetatni i metanolni ekstrakti *A. flavum* imaju visok sadržaj fenolnih jedinjenja i visoku sposobnost hvatanja DPPH radikala. Etil-acetatni ekstrakt *A. oleraceum* je takođe pokazao visoku sposobnost hvatanja DPPH radikala (Jedelská, 2007).

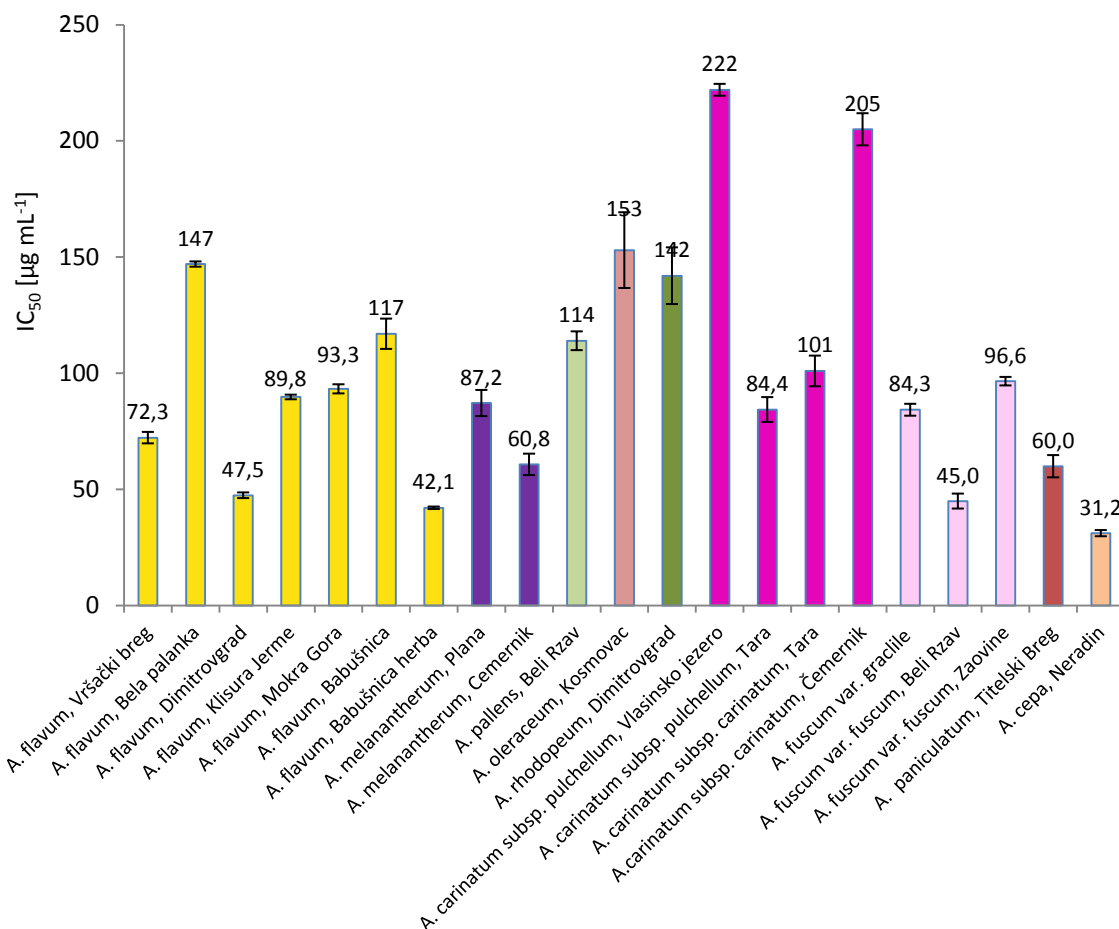
U ovom radu, u cilju procene antioksidantnog potencijala vrsta roda *Allium* sect. *Codonoprasum*, određen je ukupni redukcionni potencijal, sposobnost neutralizacije stabilnih DPPH[•] i ABTS^{•+} radikala, sposobnost hvatanja OH[•] i NO radikala, kao i sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije metanolnih ekstrakata celih biljaka ovih vrsta. Radi poređenja, u nekim testovima ispitani su i ekstrakti crnog i belog luka, kao i jedan ekstrakt nadzemnih delova biljke (za vrstu *A. flavum*). Rezultati određivanja antioksidantne aktivnosti metanolnih ekstrakata ispitivanih vrsta prikazani su u Prilogu 8.7 (Tabele 8.19.–8.45. i Grafici 8.2.–8.54.). U svim primenjenim testovima, antioksidantna aktivnost ekstrakata je bila dozno zavisna, s tim što su se krive zavisnosti inhibicije od koncentracije u najvećem broju slučajeva završavale platoon, na vrednostima inhibicije manjim od 100%, što označava da dalji porast koncentracije ekstrakta ne dovodi do povećanja aktivnosti.

Ukupni redukcionni potencijal metanolnih ekstrakata određen je merenjem sposobnosti redukcionih supstanci iz ekstrakta da reaguju sa Folin-Ciocalteu (FC) reagensom. Ova metoda se vrlo često u literaturi pominje kao metoda za određivanje ukupnih fenola u ekstraktima, gde su zapravo redukciona svojstva fenolnih jedinjenja biljaka iskorišćena za njihovo određivanje. Međutim, u slučaju da ekstrakti sadrže i druga jedinjenja sa redukcionim osobinama (amino kiseline, proteini, tioli, vitamin, neorganski joni), ova metoda nam zapravo daje informacije o ukupnom redukcionom potencijalu ekstrakta (Everette i drugi, 2010). Ukupni redukcionni potencijal ekstrakata vrsta sect. *Codonoprasum* izražen je u mg ekvivalenta galne kiseline po gramu suvog ekstrakta (mg ekv. galne kis. g⁻¹ s.e.) i kretao se od 2,15 do 15,2 mg ekv. galne kiseline g⁻¹ s.e. (Slika 4.16.). Najjaču redukcionu sposobnost ispoljili su ekstrakti vrsta *A. flavum*, *A. fuscum* i *A. paniculatum*, dok su ekstrakti *A. pallens*, *A. oleraceum*, *A. carinatum* subsp. *carinatum* i *A. rhodopeum* pokazali veoma slabu redukcionu sposobnost. Ekstrakt crnog luka (*A. cepa*) je pokazao veći redukcionni potencijal (18,83 mg ekv. galne kiseline g⁻¹ s.e.) od svih ekstrakata vrsta sect. *Codonoprasum*, ali samo za nijansu veći od ekstrakta *A. fuscum* var. *gracile* (15,18 mg ekv. galne kiseline g⁻¹ s.e.). Između uzoraka iste vrste sa različitih lokaliteta uočava se znatna varijabilnost u redukcionom potencijalu.



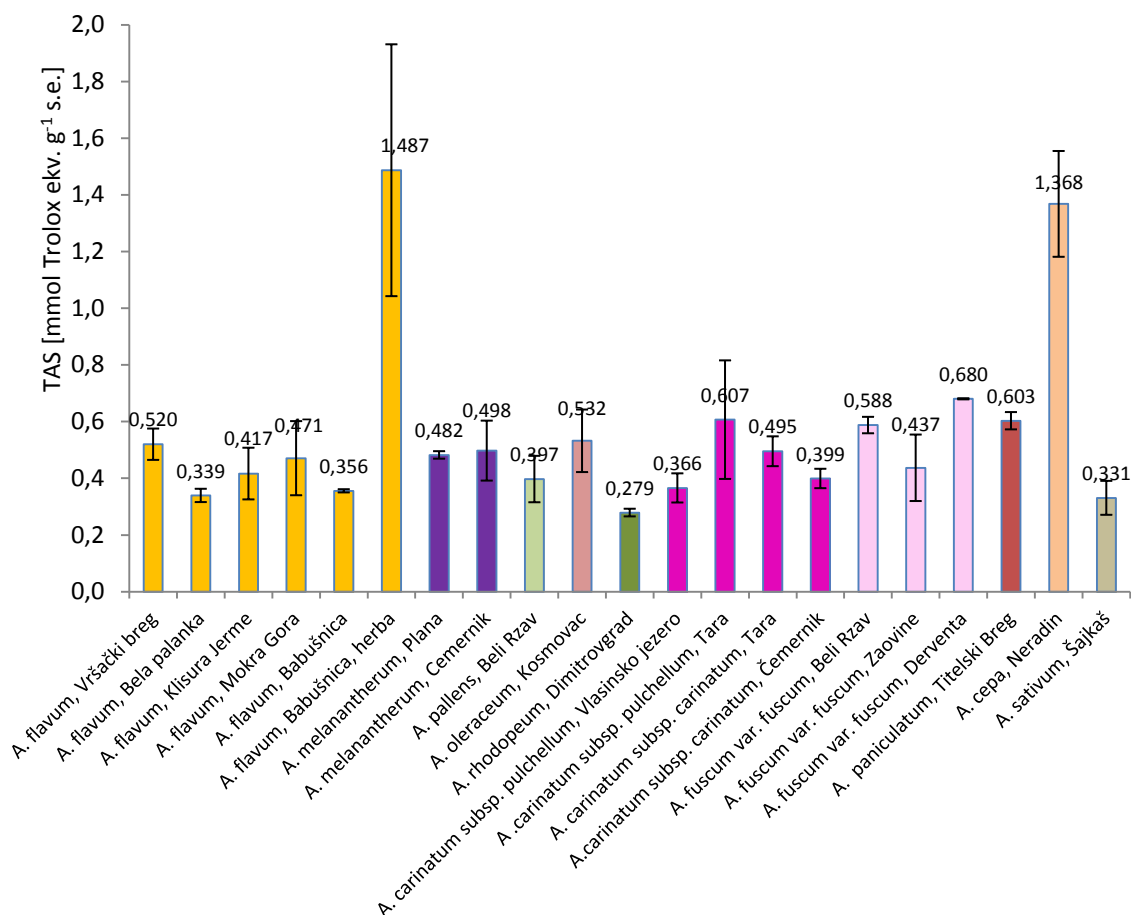
Slika 4.16. Poređenje ukupnog redukcionog potencijala 70% MeOH ekstrakata vrsta roda *Allium*

Za procenu reaktivnosti ekstrakta sa radikalskim vrstama korišćen je DPPH test u kome se meri sposobnost ekstrakta da neutrališe stabilni azot-centrirani 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil-radikal, koji je komercijalno dostupan. Svi ispitivani ekstrakti pokazali su sposobnost hvatanja DPPH radikala (DPPH-RSC), pri čemu se vrednost koncentracije ekstrakta potrebne za neutralizaciju 50% DPPH radikala kretala od $42,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $222 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Slika 4.17). Slično kao i u slučaju ukupnog redukcionog potencijala, ekstrakti vrsta *A. flavum*, *A. fuscum* i *A. paniculatum* pokazali su visok kapacitet hvatanja DPPH radikala (najniže IC_{50} vrednosti), dok su ekstrakti *A. carinatum*, *A. oleraceum* i *A. rhodopeum* ispoljili nešto slabiju aktivnost. Ekstrakt crnog luka je i u ovom testu bio najaktivniji ($IC_{50}=31,2 \mu\text{g mL}^{-1}$). Zapaža se da između uzoraka iste vrste sa različitih lokaliteta (naročito u slučaju vrsta *A. carinatum* i *A. flavum*) postoje značajne razlike u aktivnosti. Ekstrakt nadzemnog dela vrste *A. flavum* pokazao se kao jači hatač DPPH radikala od ekstrakata celih biljaka ove vrste, iz čega se može zaključiti da su jedinjenja odgovorna za aktivnost pretežno raspoređena u nadzemnim delovima biljke. U poređenju sa standardom kvercetinom ($IC_{50}=0,40 \mu\text{g mL}^{-1}$) i sintetskim antioksidansima BHT ($IC_{50}=1,54 \mu\text{g mL}^{-1}$) i BHA ($IC_{50}=11,08 \mu\text{g mL}^{-1}$, Simin i drugi, 2013), svi ispitivani ekstrakti pokazali su slabiju sposobnost hvatanja DPPH radikala.



Slika 4.17. Poređenje DPPH-RSC 70% MeOH ekstrakata vrsta roda *Allium*

Sposobnost hvatanja ABTS⁺ radikala određena je korišćenjem komercijalnog kita za ukupni antioksidantni status (Total Antioxidant Status – Biorex Diagnostics Ltd, Antrim, UK). Svi ispitivani ekstrakti ispoljili su sposobnost hvatanja ABTS⁺ radikala. Ukupna antioksidantna sposobnost (TAS) ispitivanih ekstrakata, izražena u mmol Trolox ekvivalenata po gramu suvog ekstrakta (mmol Trolox ekv. g⁻¹ s. e.), kretala se u opsegu 0,28–1,49 mmol Trolox ekv. g⁻¹ s. e. (Slika 4.18.). Između ekstrakata celih biljaka sect. *Codonoprasum* nisu uočene velike razlike u vrednostima TAS, pri čemu je najveću sposobnost hvatanja ABTS⁺ pokazao ekstrakt vrste *A. fuscum* var. *fuscum* (Derвента), dok je ekstrakt vrste *A. rhodopeum* bio najmanje aktivan. Ekstrakt nadzemnog dela biljke vrste *A. flavum* (1,49 mmol Trolox ekv. g⁻¹ s. e.) bio je više od duplo aktivniji od ekstrakata celih biljaka, što ponovo pokazuje da su jedinjenja odgovorna za aktivnost mnogo više zastupljena u nadzemnim delovima biljke nego u lukovici. Poređenjem dobijenih rezultata sa rezultatima za crni i beli luk, vidi se da je ekstrakt *A. cepa* pokazao izrazito visoku sposobnost hvatanja ABTS⁺ (sličnu kao ekstrakt nadzemnog dela vrste *A. flavum*), dok je ekstrakt belog luka bio mnogo manje aktivan (0,33 mmol Trolox ekv. g⁻¹ s. e.).



Slika 4.18. Poređenje sposobnosti hvatanja ABTS⁺ radikala 70% MeOH ekstrakata vrsta roda *Allium*

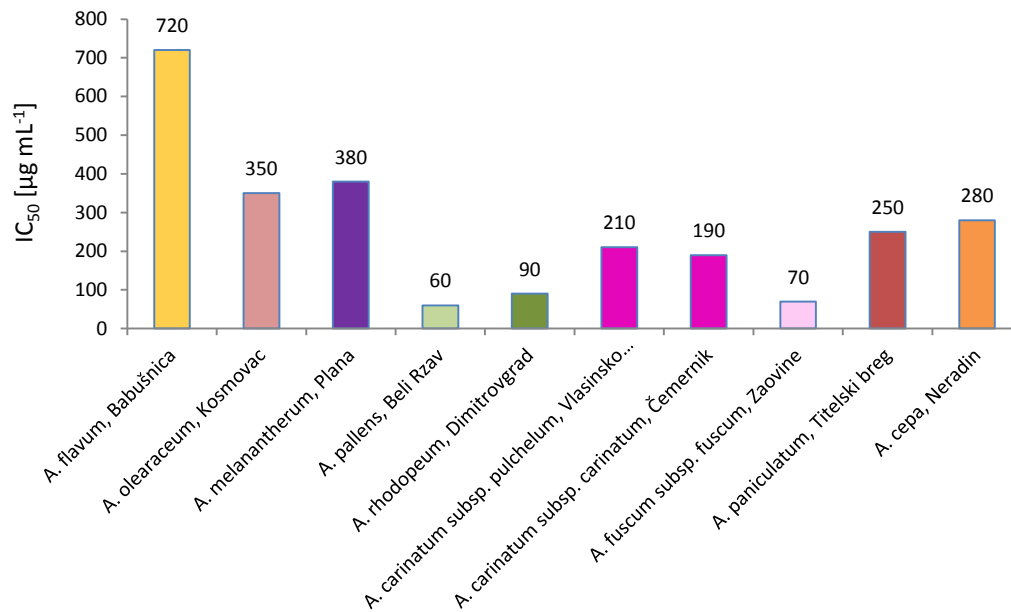
Sposobnost ekstrakata da smanje produkciju i neutrališu hidroksil radikale ($\cdot\text{OH}$), koji predstavljaju najreaktivnije, a samim tim i najtoksičnije RS u organizmu, ispitana je primenom elektron spin rezonantne (ESR) spektroskopije. S obzirom na visoku reaktivnost i relativno kratko vreme poluživota $\cdot\text{OH}$ radikala, za njegovu detekciju korišćena je *ESR spin trap* tehnika sa 5,5-dimetil-1-pirolin-N-oksidi (DMPO) kao *spin trap* agensom, koji sa $\cdot\text{OH}$ gradi nitroksidne spin adukte (DMPO-OH), čiji spektri se registruju ESR spektroskopijom. Hidroksil radikali se produkuju direktno u reakcionoj smeši u Fentonovoj reakciji. S obzirom da se $\cdot\text{OH}$ radikali i u organizmu najčešće produkuju u Fentonovoj reakciji, korišćenje ove metode za procenu sposobnosti ekstrakta da inhibira produkciju $\cdot\text{OH}$, od izuzetnog je značaja za procenu potencijalne primene ekstrakta kao antioksidantnog agensa u živim sistemima.

Sposobnost hvatanja $\cdot\text{OH}$ (OH-RSC) izračunata je poređenjem podataka dobijenih iz ESR spektara snimljenih za radne probe sa spektrima kontrolne probe (Slike 7.42.–7.46.), a IC_{50} vrednosti izračunate su iz krivih zavisnosti OH-RSC od radne koncentracije ekstrakta (Tabela 7.33.). Na Slici 4.19. dat je uporedni prikaz dobijenih IC_{50} vrednosti za ekstrakte vrsta sect. *Codonoprasum* i ekstrakt crnog luka. Svi ispitivani ekstrakti ispoljili su sposobnost hvatanja $\cdot\text{OH}$, pri čemu su se IC_{50} vrednosti kretale u opsegu od 0,06 do 0,72 mg mL⁻¹. Za razliku od prethodnih testova, ekstrakt vrste *A. flavum* pokazao je veoma slabu aktivnost (IC_{50} =720 μg mL⁻¹), dok su ekstrakti vrsta *A. pallens*, *A. fuscum* i *A. rhodopeum* bili veoma aktivni (IC_{50} vrednosti u opsegu 60–90 μg mL⁻¹). Ovakva razlika u aktivnosti najverovatnije potiče od različitih principa na kojima se zasnivaju primenjeni antioksidantni testovi. Naime, dok se u prethodna tri testa prvenstveno meri redukciona sposobnost uzorka (sposobnost doniranja elektrona ili H atoma), testom za određivanje

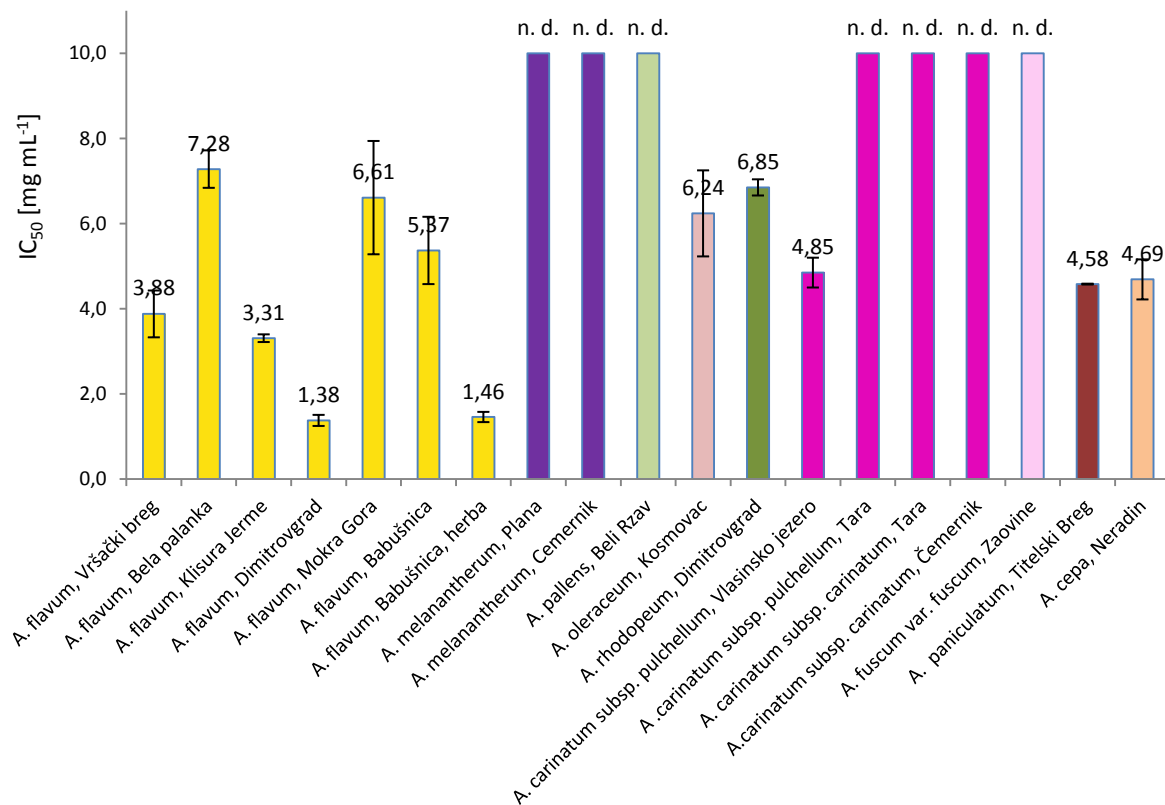
OH-RSC meri se i sposobnost ekstrakta da kompleksira jone prelaznih metala. Iz ovoga proizilazi da su ekstrakti *A. pallens* i *A. rhodopeum* bogati jedinjenjima sa helirajućim svojstvima, koja kompleksiraju jone gvožđa i sprečavaju Fentonovu reakciju, a samim tim i produkciju hidroksil radikala. S druge strane, ekstrakt *A. fuscum* istovremeno sadrži i jedinjenja sa dobrim helirajućim svojstvima i jedinjenja sa redukcionim osobinama. Ekstrakt crnog luka pokazao je umerenu sposobnost hvatanja $\cdot\text{OH}$ ($\text{IC}_{50}=280 \mu\text{g mL}^{-1}$), sličnu kao i ekstrakti *A. paniculatum*, *A. carinatum*, *A. oleraceum* i *A. melanantherum* (IC_{50} u opsegu $190\text{--}380 \mu\text{g mL}^{-1}$). U poređenju sa sintetskim antioksidansom BHA ($\text{IC}_{50}=1,54 \text{ mg mL}^{-1}$, Babovic i drugi, 2010), ispitivani ekstrakti pokazali su veću sposobnost hvatanja $\cdot\text{OH}$ radikala.

Sposobnost ekstrakata da neutrališu $\text{NO}\cdot$ radikale, spontano generisane iz natrijum-nitroprusida u vodenom rastvoru pri fiziološkom pH, određena je spektrofotometrijskom metodom sa Griess-ovim reagensom. Na Slici 4.20. dat je uporedni prikaz IC_{50} vrednosti za ekstrakte vrsta sect. *Codonoprasum* i ekstrakt crnog luka. Ekstrakti *A. melanantherum*, *A. pallens*, *A. fuscum* var. *fuscum*, *A. carinatum* subsp. *carinatum* i *A. carinatum* subsp. *pulchelum* (Tara) pokazali su veoma slabu sposobnost hvatanja NO radikala, pa u ispitivanom opsegu koncentracija ($1\text{--}10 \text{ mg mL}^{-1}$) nije dostignuta IC_{50} vrednost. Snažnu "skevindžer" aktivnost prema NO radikalima pokazali su ekstrakt cele biljke vrste *A. flavum* sa lokaliteta Dimitrovgrad i ekstrakt nadzemnih delova vrste *A. flavum* sa lokaliteta Babušnica ($\text{IC}_{50}=1,38 \text{ mg mL}^{-1}$ i $\text{IC}_{50}=1,46 \text{ mg mL}^{-1}$, respektivno), dok su ostali ispitivani ekstrakti pokazali umerenu NO-RSC (IC_{50} vrednosti u opsegu $3,31\text{--}7,28 \text{ mg mL}^{-1}$), ali svakako jaču od sintetskog antioksidansa BHA, kod koga se IC_{50} vrednost ne postiže ni pri koncentraciji od 10 mg mL^{-1} (Simin i drugi, 2013). S obzirom da NO ima veoma važne funkcije u regulaciji ćelijskih procesa i u imunom odgovoru organizma, jedinjenja sa snažnom sposobnošću neutralizacije NO radikala, mogla bi da imaju i negativan efekat na homeostazu u ćeliji. Zbog toga su agensi sa umerenom sposobnošću neutralizacije NO radikala možda čak i bolji kandidati za sprečavanje toksičnih efekata do kojih dovodi NO kada se nađe u prekomernoj koncentraciji i reaguje sa superoksidanjonom gradeći reaktivni peroksinitrit.

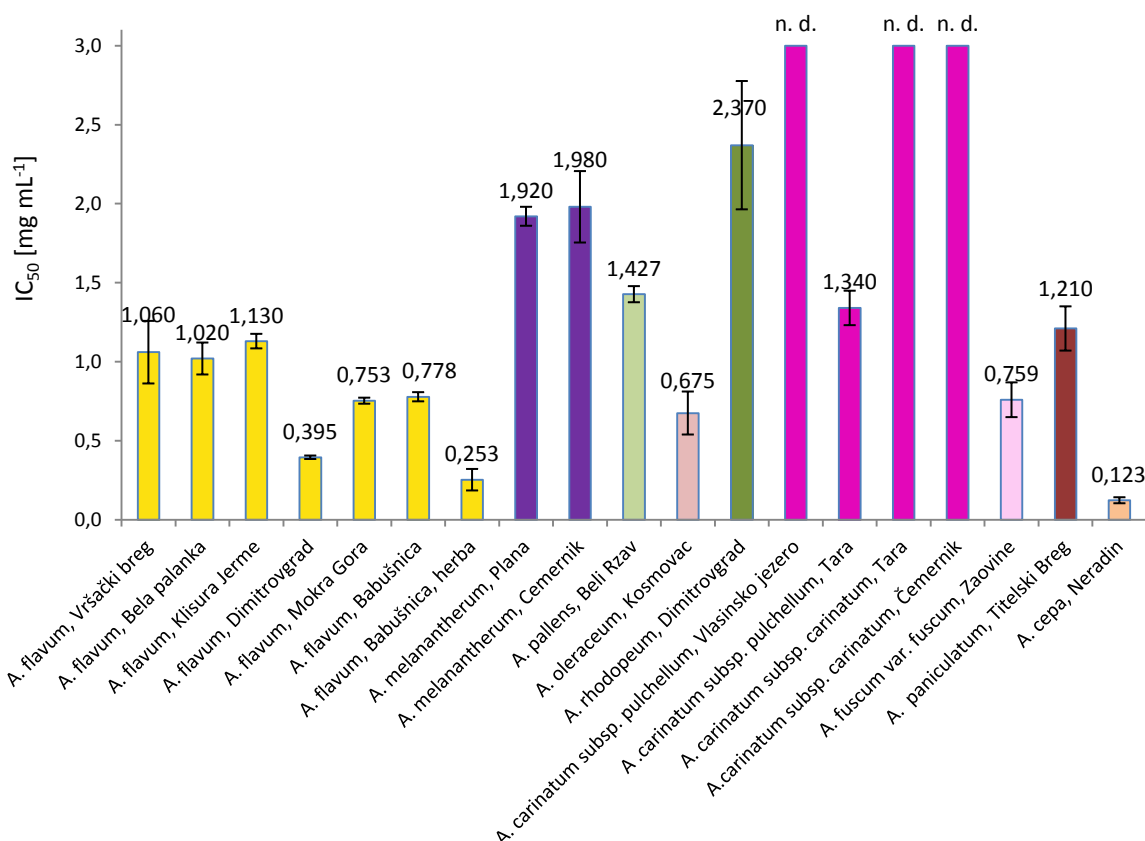
Uticaj ispitivanih ekstrakata na stepen Fe^{2+} /askorbat indukovane lipidne peroksidacije određen je pomoću TBA testa, koji se zasniva na merenju intenziteta obojenosti kompleksa nastalog u reakciji tiobarbiturine kiseline (TBA) i malonildialdehida (MDA), jednog od krajnjih produkata lančane slobodnoradikalne peroksidacije nezasićenih masnih kiselina. Kao izvor nezasićenih masnih kiselina korišćeno je laneno ulje, koje sadrži 69,7 % linoleinske i 13,5 % linolne kiseline. Najslabiju sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije pokazali su ekstrakti podvrste *A. carinatum* subsp. *carinatum*, kao i ekstrakt podvrste *A. carinatum* subsp. *pulchelum* sa lokaliteta Vlasinsko jezero, kod kojih nije dostignuta IC_{50} vrednost. Nasuprot tome, ekstrakti vrsta *A. flavum*, *A. oleraceum* i *A. fuscum* var. *fuscum* su bili veoma aktivni kao inhibitori lipidne peroksidacije (IC_{50} vrednosti u opsegu $0,253\text{--}1,13 \text{ mg mL}^{-1}$). Ekstrakti *A. paniculatum*, *A. pallens*, *A. rhodopeum*, *A. melanantherum* i *A. carinatum* subsp. *pulchelum* sa lokaliteta Tara pokazali su umerenu aktivnost. Ekstrakt nadzemnog dela vrste *A. flavum* ($\text{IC}_{50}=0,253 \text{ mg mL}^{-1}$) bio je više od duplo aktivniji od ekstrakata celih biljaka, što još jednom dokazuje da su jedinjenja odgovorna za antioksidantnu aktivnost mnogo više zastupljena u nadzemnim delovima biljke nego u lukovici. Poređenjem dobijenih rezultata sa rezultatima za crni luk, vidi se da je ekstrakt *A. cepa* ispoljio duplo veću sposobnost inhibicije LP ($\text{IC}_{50}=0,123 \text{ mg mL}^{-1}$) od najaktivnijeg ekstrakta predstavnika sect. *Codonoprasum* (ekstrakta nadzemnog dela vrste *A. flavum*). Sintetski antioksidans BHA, takođe pokazuje znatno jaču sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije ($\text{IC}_{50}=0,024 \text{ mg mL}^{-1}$, Simin i drugi, 2013) od svih ispitivanih ekstrakata.



Slika 4.19. Poređenje sposobnosti hvatanja $\cdot\text{OH}$ radikala 70% MeOH ekstrakata odabranih vrsta roda *Allium*



Slika 4.20. Poređenje NO-RSC 70% MeOH ekstrakata vrsta roda *Allium*



Slika 4.21. Poređenje sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije 70% MeOH ekstrakata vrsta roda *Allium*

Primenom regresione analize izračunati su korelacioni faktori (Pearson-ovi koeficijenti) između rezultata različitih testova za određivanje antioksidantne aktivnosti, pri čemu su u slučaju koreliranja IC₅₀ vrednosti sa rezultatima za ukupni redukcionni potencijal i sposobnost hvatanja ABTS⁺⁺ radikala, korišćene recipročne vrednosti IC₅₀ (Tabela 4.9.).

Tabela 4.9. Vrednosti korelacionih faktora (Pearson-ovi koeficijenti) između antioksidantnih aktivnosti 70% metanolnih ekstrakata ispitivanih vrsta roda *Allium* dobijenih primenom različitih testova

	DPPH-RSC	ABTS-RSC	OH-RSC	NO-RSC	I (LP)
URP	0,811	0,759	-0,349	0,506	0,768
ABTS-RSC	0,886		-0,289	0,702	0,850
OH-RSC	-0,120			-0,398	-0,296
NO-RSC	0,447				0,432
I (LP)	0,635				

URP – Ukupni redukcionni potencijal; I (LP) – Inhibicija lipidne peroksidacije; ■ – visoka pozitivna korelacija; □ – umerena pozitivna korelacija; □ – blaga negativna korelacija

Iz izračunatih Pearson-ovih koeficijenata vidi se da visoka korelacija postoji između rezultata ukupnog redukcionnog potencijala, sposobnosti neutralizacije DPPH i ABTS⁺⁺ radikala i sposobnosti inhibicije LP. Takođe, sposobnost hvatanja NO je u veoma dobroj korelaciji sa sposobnošću hvatanja ABTS⁺⁺ radikala i umerenoj korelaciji sa ukupnim redukcionnim potencijalom, sposobnošću hvatanja DPPH i sposobnošću inhibicije LP. Nasuprot tome, OH-RSC je u blagoj negativnoj korelaciji sa rezultatima svih ostalih testova. Iz svega navedenog može se zaključiti da su u ekstraktima *A. flavum*, *A. fuscum* var. *fuscum*, *A. oleraceum* i *A. paniculatum*, koji su ispoljili snažnu antioksidantnu aktivnost u testovima za određivanje sposobnosti hvatanja

DPPH[•], ABTS^{•+} i NO radikala i sposobnosti inhibicije LP, prisutna jedinjenja sa visokom redukcionom sposobnošću, odnosno sposobnošću doniranja elektrona ili H atoma. Ekstrakt nadzemnih delova vrste *A. flavum* ispoljio je primetno jaču aktivnost u pomenutim testovima od ekstrakata celih biljaka ove vrste, pa se može zaključiti da su fenolna jedinjenja, čija je koncentracija znatno viša u ekstraktu herbe nego u ekstraktu lukovice (Tabela 4.3.), odgovorna za izrazite redukcijske osobine ovog ekstrakta.

Izuzetno visoka koncentracija rutina u nekim ispitivanim ekstraktima, naročito u ekstraktu *A. melanatherum*, malo doprinosi antioksidantnoj aktivnosti ekstrakta, zato što je 3-OH grupa prstena C koja je od izuzetnog značaja za aktivnost kvercetina i njegovih derivata, u ovom jedinjenju blokirana (glikozidnom vezom sa rutinozom), pa preostaje samo 3',4'-dihidroksi struktura prstena B kao učesnik u reakcijama antioksidantne zaštite (Rice-Evans i drugi, 1996). Osim toga, rutin i kada se unese u organizam putem hrane ne može biti deglikozilovan, jer čovek nema enzime za deglikozilaciju ramnoze, a ni absorbovan jer nema nosača za ramnozu, već stiže u debelo crevo u intaktnom obliku. U debelom crevu se pod dejstvom crevne flore rutin hidrolizuje do kvercetina, od koga se jedan mali deo absorbuje od strane kolonocita i dospeva u krv, a drugi deo se razgrađuje na manje produkte, koji se onda absorbuju i odlaze u krv (Simin, 2008). Iz svega navedenog proizilazi da prisustvo velikih količina rutina u biljci, nema veliki značaj za antioksidantnu aktivnost te biljke kako *in vitro* tako i *in vivo*.

Ekstrakt crnog luka je u poređenju sa ekstraktima celih biljaka vrsta sect. *Codonoprasum* u svim navedenim testovima ispoljio jaču aktivnost (osim u testu za sposobnost hvatanja OH radikala), što se može objasniti činjenicom da su u crnom luku dominantna fenolna jedinjenja kvercetin-3,4'-O-diglukozid, kvercetin-4'-O-glukozida i aglikon kvercetin, kod kojih je 3-OH grupa prstena C slobodna, što doprinosi njihovoj većoj antioksidantnoj aktivnosti. Ekstrakt nadzemnih delova vrste *A. flavum* pokazao je sličnu aktivnost u većini testova kao ekstrakt crnog luka. U odnosu na sintetski antioksidans BHA, ekstrakti vrsta sect. *Codonoprasum* pokazali su znatno manji DPPH-RSC i sposobnost inhibicije LP, a veću sposobnost hvatanja [•]OH i NO radikala. Međutim, upotreba prirodnih antioksidanasa je favorizovana i kada imaju manje antioksidantne sposobnosti od sintetskih, s obzirom da sintetski antioksidansi često imaju štetne efekte na organizam (Park i drugi, 1990).

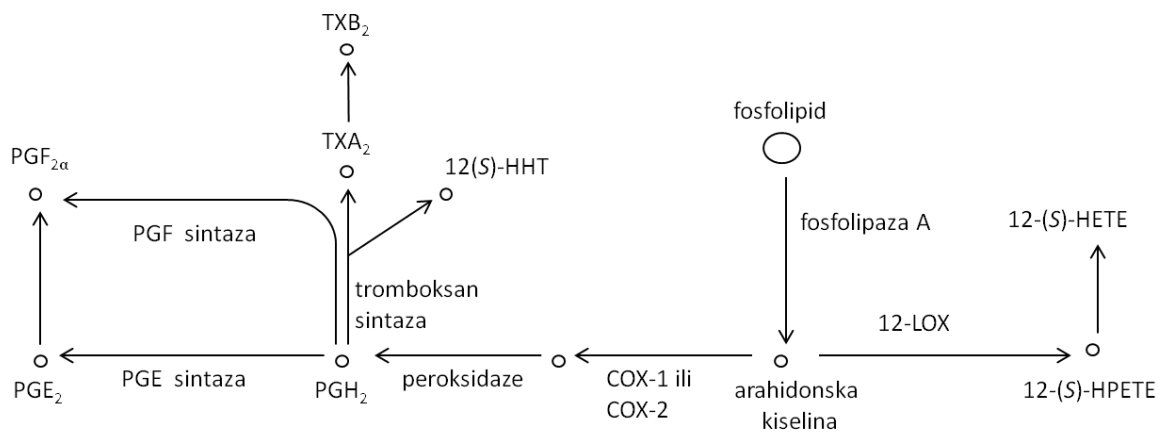
Ekstrakti vrsta *A. pallens* i *A. rhodopeum*, iako slabi redukujući agensi, pokazali su dobra helatorska svojstva, zbog čega su snažno inhibirali generisanje [•]OH radikala u Fentonovoj reakciji.

Ekstrakt *A. fuscum* var. *fuscum*, jedini se izdvojio kao agens sa snažnim antioksidantnim delovanjem na više nivoa, istovremeno pokazavši snažna redukujuća i helatorska svojstva, kao i umerenu sposobnost neutralizacije NO radikala. Iz svega navedenog, proizilazi da *A. fuscum* var. *fuscum* zadovoljava sve zahteve za dobrog antioksidantnog agensa, pa bi se mogao preporučiti za primenu u fitofarmaciji i kao dodatak ishrani.

4.3 ANTIINFLAMATORNA AKTIVNOST EKSTRAKATA

Poznato je da crni i beli luk pokazuju antiinflamatornu aktivnost, i to na različitim nivoima. Beli luk ispoljava svoje antiinflamatorno delovanje tako što inhibira oksidaciju LDL-a (Ide i Lau, 2001), a isto tako i ciklooksigenazni i lipoksigenazni put metabolizma arahidonske kiseline i aktivnost fosfolipaze A₂ (Park, 2011; Kim i saradnici, 2005; Srivastava, 1984; Srivastava, 1989; Srivastava i Tyagi, 1993; Ali i drugi, 2000; Sengupta i drugi, 2004). Tiosulfinati i cepaeni izolovani iz crnog luka snažno inhibiraju delovanje 5-LOX iz leukocita i COX iz mikrozoma (Dorsch, 1997), dok vodeni ekstrakt crnog luka pokazuje inhibitornu aktivnost na sintezu tromboksana u trombocitima *in vitro* (Srivastava, 1984; Srivastava, 1986). *Allium ursinum* i *Allium ascalonicum* takođe su pokazali antiinflamatornu aktivnost u *in vivo* eksperimentima (Pâravu i drugi 2014; Mohammadi-Motlagh, 2011). Lukovi iz sekcije *Codonoprasum*, međutim, do sada nisu bili ispitivani sa aspekta antiinflamatornog delovanja, pa je to izabrano za jedan od ciljeva ovog rada.

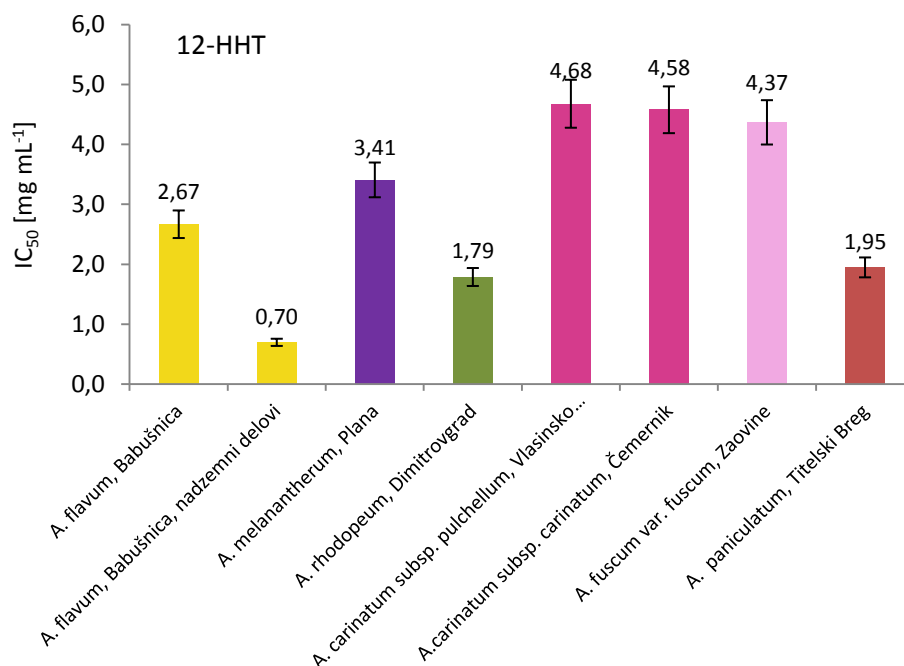
Antiinflamatorni potencijal ekstrakata odabranih vrsta sect. *Codonoprasum* ispitan je u humanim trombocitima u *ex vivo* uslovima, merenjem inhibitornog efekta na produkciju metabolita arahidonske kiseline u COX-1 i 12-LOX biosintetskom putu (Slika 4.22.). Trombociti su odabrani jer sadrže oba ciljana enzima, a pored toga omogućavaju dobijanje realnije slike o delovanju ekstrakata u fiziološkim uslovima nego kada se ispitivanja izvode na izolovanim enzimima. Proces inflamacije u trombocitima izazvan je dodatkom Ca²⁺ i kalcijumove jonofore (A23184, kalcimicin), a zatim je određena količina produkata metabolizma endogene arahidonske kiseline – eikozanoida. Od produkata COX-1 metaboličkog puta kvantifikovani su 12-HHT, tromboksan B₂ (TXB₂) i prostaglandin E₂ (PGE₂), dok je 12-HETE kvantifikovana kao proizvod 12-LOX puta. 12-HHT nastaje kao sporedni proizvod u reakciji prevođenja PGH₂ u tromboksane i njena količina je direktno proporcionalna aktivnosti COX, što je iskorišćeno u mnogim metodama za određivanje aktivnosti ovog enzima (Beara i drugi, 2010).



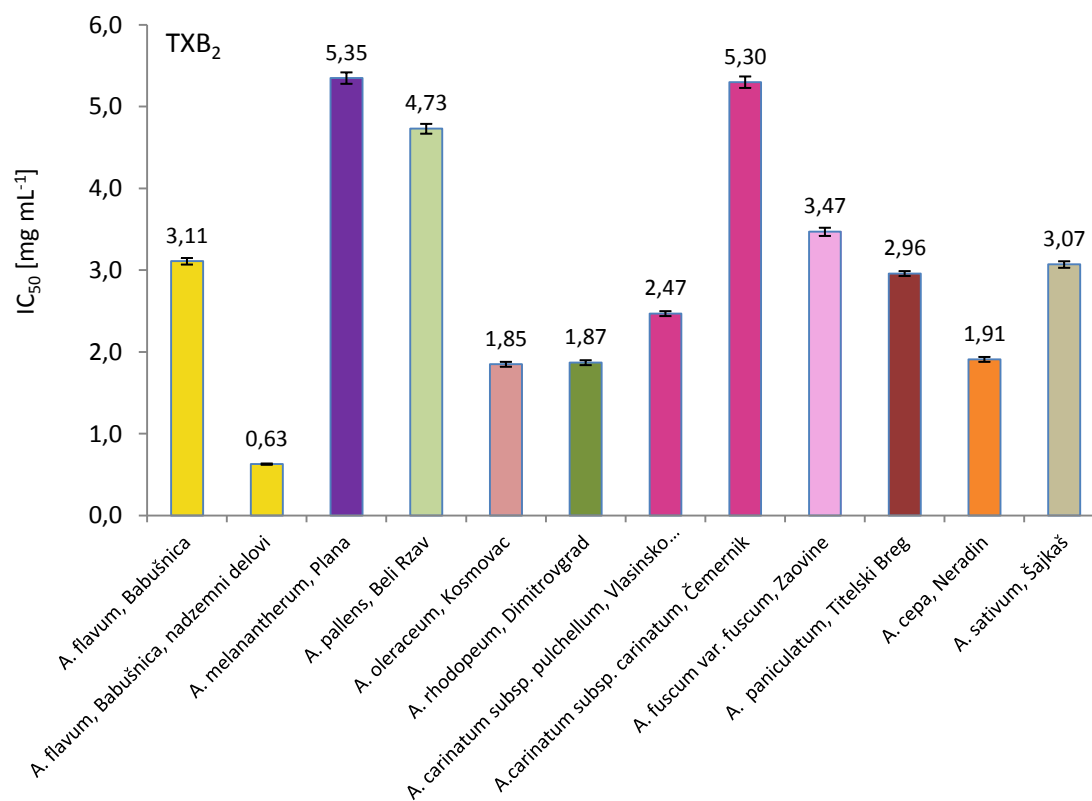
Slika 4.22. Šema COX i 12-LOX grane eikozanoidnog biosintetskog puta

Za kvantifikaciju eikozanoida odabrana je tandemska masena spektrometrija (LC-MS/MS), jer je daleko osjetljivija i specifičnija od tradicionalnih tehnika sa UV detekcijom i nije potreban dodatak hromofora (Beara i drugi, 2010). Da bi se izbeglo konstruisanje kalibracionih krivih za svaki standard i simultano kompenzovao uticaj matriksa, odnosno izbegle moguće greške koje nastaju usled gubitaka nastalih metabolita tokom faze izolovanja, korišćena je metoda dodatka internog standarda, u ovom slučaju prostaglandina B₂ (PGB₂). Step en inhibicije određen je na osnovu relativnog odnosa površina pikova analita i internog standarda. U nekim probama količina

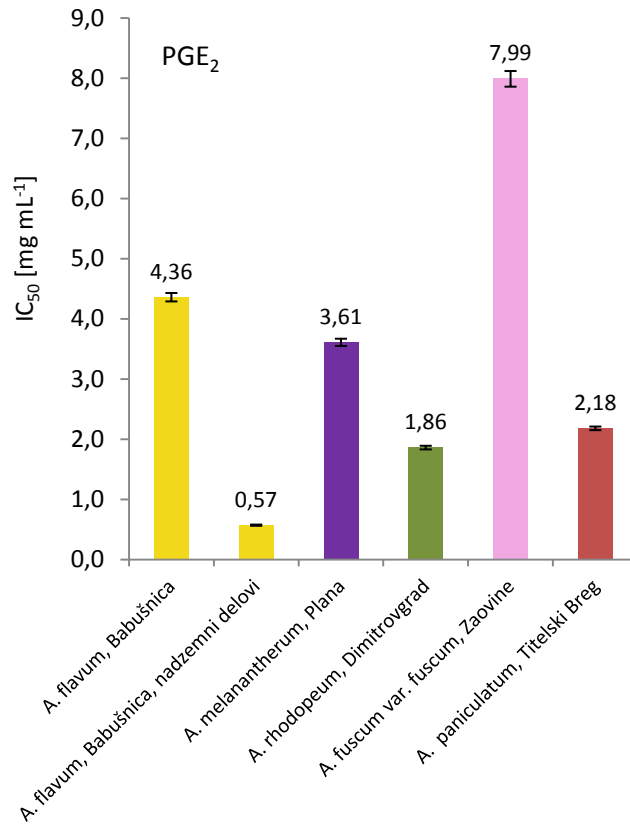
produkovanih 12-HHT i PGE₂ je bila suviše mala da bi se mogao pratiti uticaj ekstrakata na ove metabolite, pa je u ovim slučajevima određen samo uticaj na TXB₂ i 12-HETE. Dobijeni rezultati prikazani su u *Prilogu 8.8 (Tabele 8.46.-8.56 i Grafici 8.55-8.93.)* i na *Slikama 4.23-4.28.*



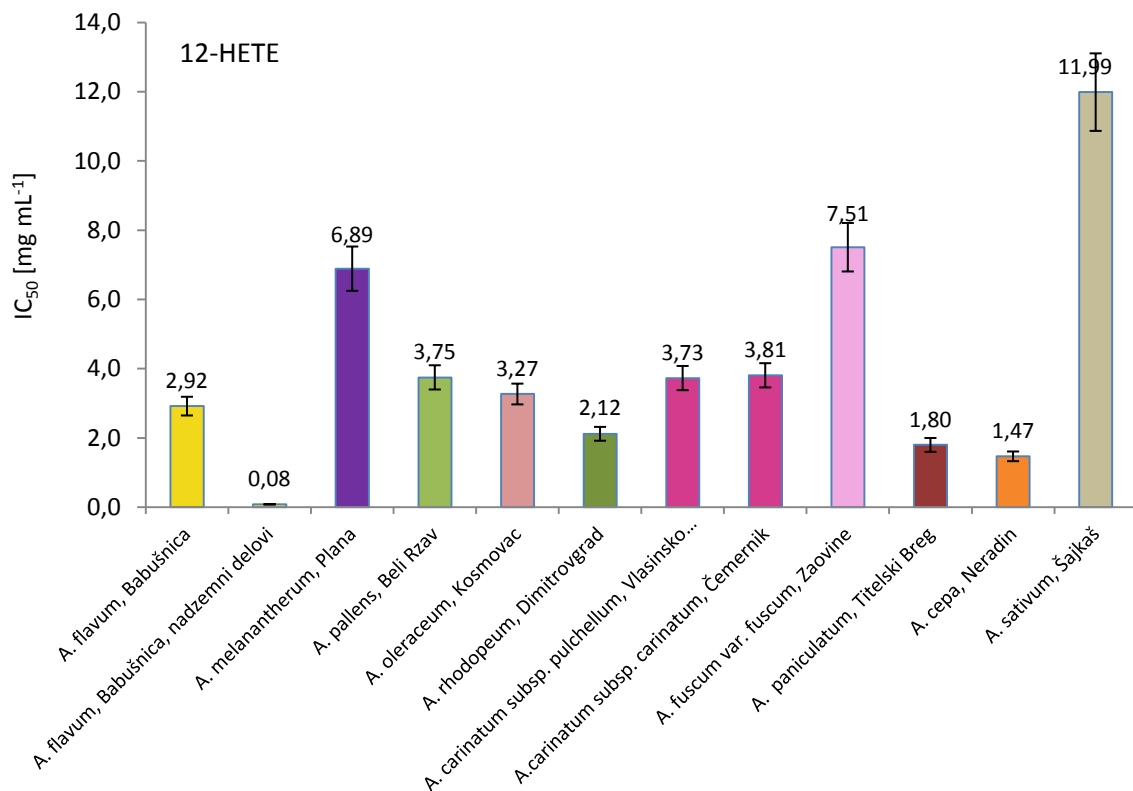
Slika 4.23. Poređenje sposobnosti inhibicije produkcije 12-HHT 70% MeOH ekstrakata vrsta roda *Allium*



Slika 4.24. Poređenje sposobnosti inhibicije produkcije TXB₂ 70% MeOH ekstrakata vrsta roda *Allium*



Slika 4.25. Poređenje sposobnosti inhibicije produkcije PGE₂ 70% MeOH ekstrakata vrsta roda *Allium*



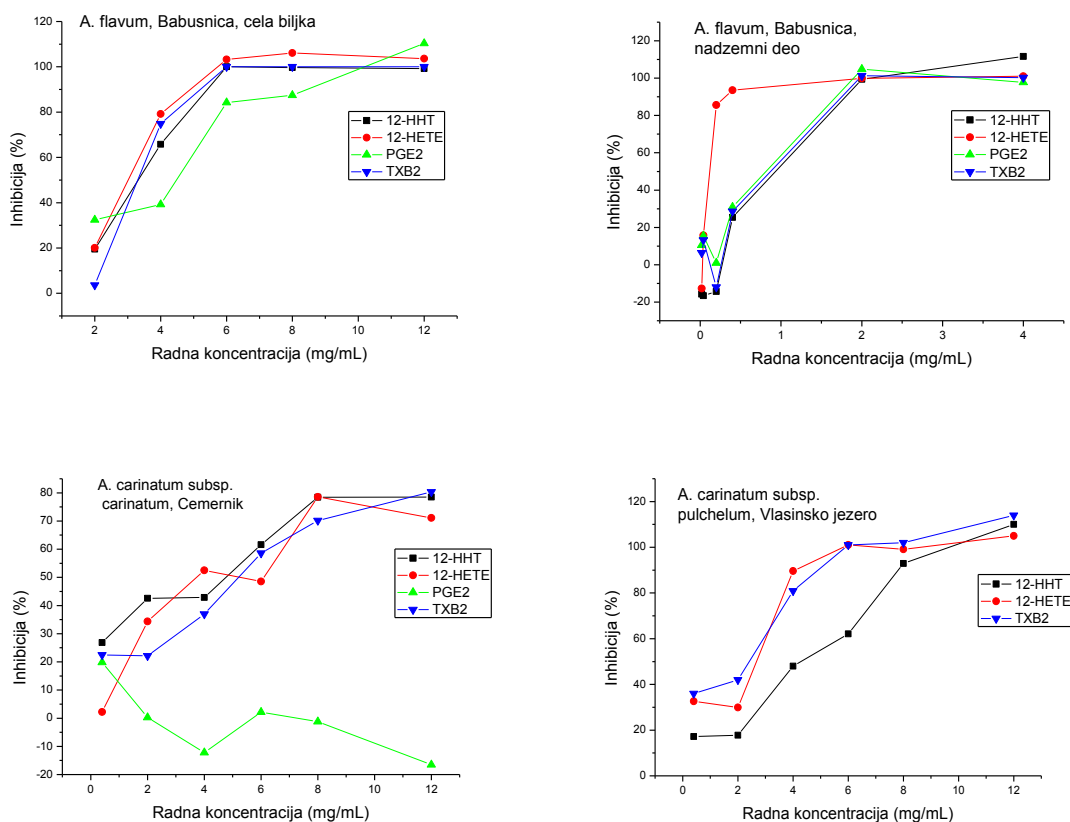
Slika 4.26. Poređenje sposobnosti inhibicije produkcije 12-HETE 70% MeOH ekstrakata vrsta roda *Allium*

Iz prikazanih rezultata (Prilog 8.8) vidi se da svi ispitivani ekstrakti pokazuju dozno-zavisnu inhibitornu aktivnost na enzime COX-1 i 12-LOX puta. IC₅₀ vrednosti za inhibiciju produkcije 12-HHT kretale su se u opsegu od 0,70 mg mL⁻¹ do 4,68 mg mL⁻¹ (Slika 4.23.), za TXB₂ od 0,63 mg mL⁻¹ do 5,35 mg mL⁻¹ (Slika 4.24.), za PGE₂ od 0,57 mg mL⁻¹ do 7,99 mg mL⁻¹ (Slika 4.25.), a za 12-HETE od 0,08 mg mL⁻¹ do 11,99 mg mL⁻¹ (Slika 4.26.). U poređenju sa poznatim COX-1 inhibitorom aspirinom (IC₅₀=5 µg mL⁻¹ za 12-HHT, TXB₂ i PGE₂ (Lesjak, 2011)) i 12-LOX inhibitorom kvercetinom (IC₅₀=7,4 µg mL⁻¹ za 12-HETE (Lesjak 2011)), ekstrakti ispitivanih vrsta roda *Allium* pokazali su slabiju sposobnost inhibicije ovih enzima. Međutim, aktivnost ekstrakata ispitivanih vrsta roda *Allium* bila je uporediva sa prethodno objavljenim rezultatima za dobro poznatu antiinflamatornu drogu *Plantago major* L. (IC₅₀=0,65 mg mL⁻¹ za 12-HHT i IC₅₀=1,73 mg mL⁻¹ za 12-HETE) (Beara i drugi, 2010). Slično kao i u antioksidantim testovima, ekstrakt nadzemnih delova vrste *A. flavum* ispoljio je znatno jaču antiinflamatornu aktivnost od ekstrakta cele biljke, što ukazuje da se jedinjenja odgovorna za aktivnost ove vrste prvenstveno nalaze u herbi, a ne u lukovici. Ekstrakt nadzemnih delova vrste *A. flavum* pokazao je jaču aktivnost i od svih ostalih ekstrakata ispitivanih vrsta. Pored pomenutog ekstrakta snažan inhibitorni potencijal na enzime ciklooksigenaznog i 12-(S)-lipoksigenaznog puta pokazali su ekstrakti celih biljaka vrsta *A. rhodopeum*, *A. oleraceum*, *A. paniculatum* i *A. cepa*, dok su ekstrakti vrsta *A. carinatum*, *A. fuscum*, *A. pallens*, *A. melanantherum* i *A. sativum* ispoljili veoma slabu aktivnost. U ranijim istraživanjima dokazano je da rutin i kvercetin selektivno inhibiraju izotipsku formu II fosfolipaze A₂ (PLA₂-II) koja se nalazi u trombocitima i igra važnu ulogu u inflamaciji (Takasaki i drugi, 1998), pa se može zaključiti da je prisustvo ovih jedinjenja u ekstraktima ispitivanih vrsta roda *Allium* delimično odgovorno za antiinflamatornu aktivnost. Takođe, utvrđeno je da za sposobnost flavonoida da inhibira PLA₂-II neophodno prisustvo nezasićene veze i 4-oksi grupe u prstenu C i hidroksilnih grupa u 3'- i 4'- položajima prstena B (Lindahl i Tagesson, 1997). Pored rutina i aglikona kvercetina, od flavonoida zastupljenih u ekstraktima roda *Allium*, ovaj uslov ispunjavaju i glikozidi kvercetina – izokvercitrin i hiperozid, što ukazuje da ova jedinjenja takođe mogu inhibirati produkciju eikozanoida. Međutim, s obzirom da nije utvrđena jasna korelacija između antiinflamatorne aktivnosti i sadržaja kvantifikovanih fenolnih jedinjenja, proizilazi da udeo u aktivnosti imaju i pripadnici drugih klasa sekundarnih biomolekula koji su prisutni u ekstraktima.

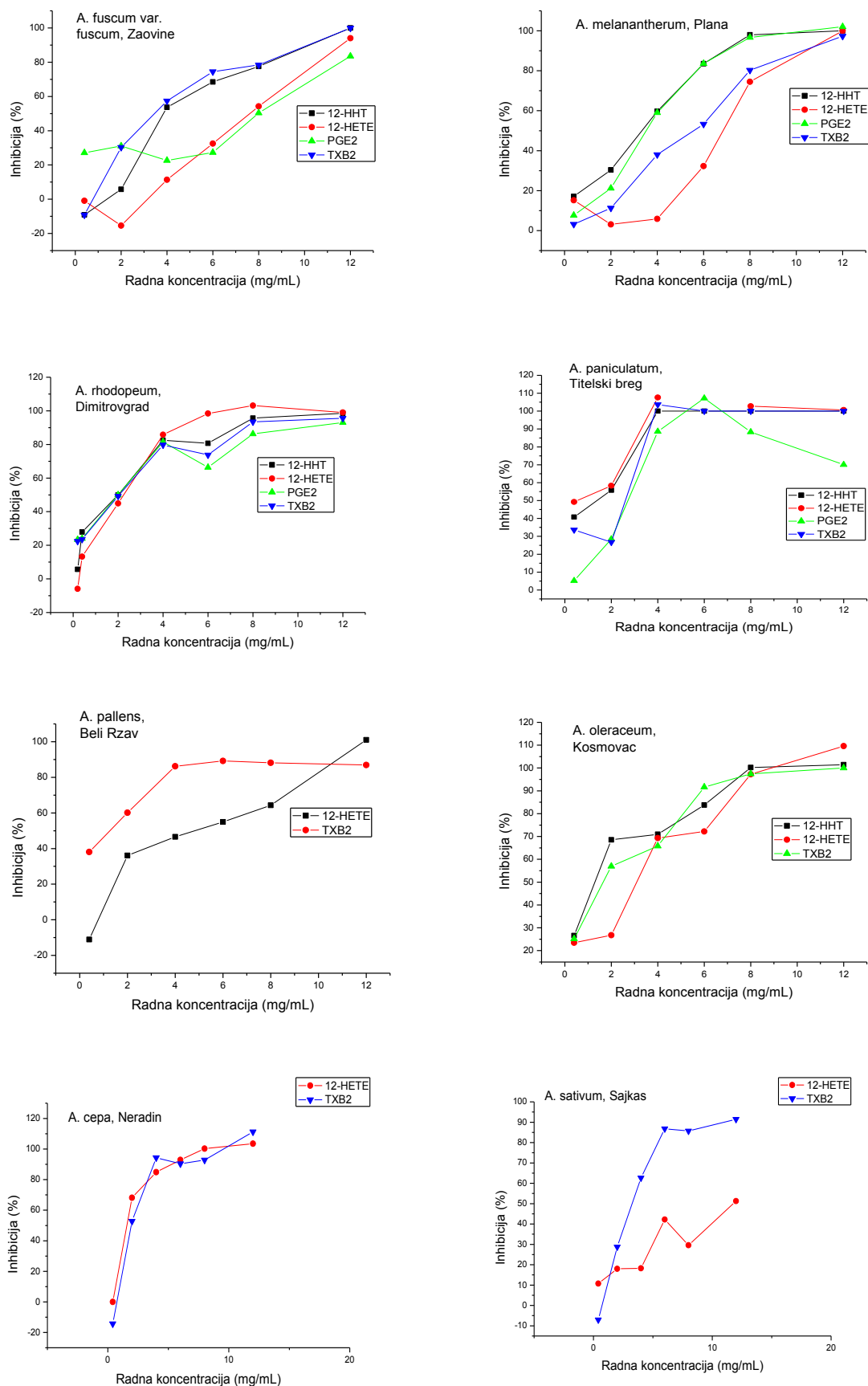
Iz krivih zavisnosti inhibicije produkcije metabolita arahidonske kiseline od koncentracije ekstrakata (Slike 4.27 i 4.28.), zapaža se dobro poklapanje krivih za sva četiri metabolite četiri metabolita kod ekstrakata vrsta *A. flavum* – cela biljka i *A. rhodopeum*, na osnovu čega se mogu pretpostaviti dva mehanizma delovanja ovih ekstrakata: inhibicija reakcije katalizovane fosfolipazom A₂ (početnog koraka u metabolizmu arahidonske kiseline), ili inhibicija nekoliko enzima koji katalizuju formiranje praćenih metabolita (12-LOX, COX-1, tromboksan sintaze ili PGE sintaze) (Slika 4.22.). Kod ekstrakata vrsta *A. oleraceum* i *A. cepa* zabeleženo je takođe dobro poklapanje krivih inhibicije za produkte obe grane (COX i LOX) metaboličkog puta arahidonske kiseline, ali s obzirom da nisu praćeni sva četiri metabolita, nije bilo moguće utvrditi koji enzimi su inhibirani. Dobro poklapanje krivih inhibicije sva četiri praćena metabolita zabeleženo je i kod ekstrakta *A. paniculatum*, ali samo pri koncentracijama ekstrakta nižim od 6 mg/ml, dok pri višim koncentracijama kriva inhibicije produkcije PGE₂ blago opada, iz čega se može pretpostaviti da ekstrakt ne inhibira PLA₂, već samo neke od enzima COX-1 puta, kao i 12-LOX. Do opadanje krive inhibicije produkcije PGE₂ verovatno dolazi zbog toga što neke komponente ekstrakta u velikoj koncentraciji aktiviraju neki od enzima biosinteze PGE₂ (najverovatnije PGE sintazu). U slučaju ekstrakta nadzemnih delova vrste *A. flavum* kriva inhibicije produkcije 12-HETE ne poklapa se sa krivama za metabolite COX-1 puta (12-HHT, TXB₂ i PGE₂), ukazujući na to da ovaj ekstrakt ima jači inhibitorni potencijal za 12-LOX nego za COX-1 i da se u koncentracijama ispod 0,25 mg mL⁻¹ ponaša kao selektivni 12-LOX inhibitor. Iz krivih inhibicije se takođe vidi da je

produkcija 12-HETE, 12-HHT i TXB₂ dozno-zavisno inhibirana u prisustvu ekstrakta *A. carinatum* subsp. *carinatum*, dok produkcija PGE₂ nije inhibirana. Iz ovog sledi da se smanjenje koncentracije 12-HHT i TXB₂ u prisustvu ovog ekstrakta ne može pripisati inhibiciji COX-1 ili PLA₂ (jer bi to rezultovalo i smanjenjem koncentracije PGE₂), nego inhibiciji tromboksan-sintaze koja konvertuje PGH₂ u TXA₂ (i, dalje, u TXB₂) i 12-HHT, i inhibiciji 12-LOX. Ekstrakti *A. melanatherum*, *A. carinatum* subsp. *pulchelum*, *A. pallens* i *A. sativum* ispoljili su nešto jaču sposobnost inhibicije enzima COX-1 puta u odnosu na 12-LOX. Ekstrakt *A. fuscum* var. *fuscum* pokazao je nešto veću sposobnost inhibicije produkcije 12-HHT i TXB₂ u odnosu PGE₂ i 12-HETE, što ukazuje na to da ovaj ekstrakt ne inhibira PLA₂, već samo neke od enzima COX-1 puta i 12-LOX, pri čemu jače inhibira tromboksan sintazu, nego PGE sintazu i 12-LOX.

Tačan mehanizam inhibicije COX i LOX enzima od strane prirodnih proizvoda još uvek nije poznat. Međutim, ako se uzmu u obzir strukturne i hemijske karakteristike ovih enzima, moguće je predložiti nekoliko mehanizama. Naime, obe grane metabolizma arahidonske kiseline uključuju sloodnoradikalne reakcije. Zahvaljujući svojim sposobnostima hvatanja slobodnih radikala i redukcionim osobinama, mnogi prirodni proizvodi mogu uticati na reakcije katalizovane COX i LOX enzimima (Hostettmann, 1991). Oni mogu neutralisati radikalne intermedijere i na taj način zaustaviti reakcije. Takođe, mogu redukovati Fe³⁺ koji se nalazi u aktivnom centru i COX i LOX enzima i koji je neophodan za reakciju inicijacije. Neki prirodni proizvodi se takođe mogu kovalentno vezati za enzime i na taj način ih ireverzibilno inhibirati (Schneider i Bucar, 2005). Na kraju, smanjenje COX i LOX aktivnosti može biti uzrokovano i supresijom njihove transkripcije od strane fenolnih jedinjenja, ali ova aktivnost može biti uočena samo u dugotrajnim eksperimentima (Lee i Kim, 2010).

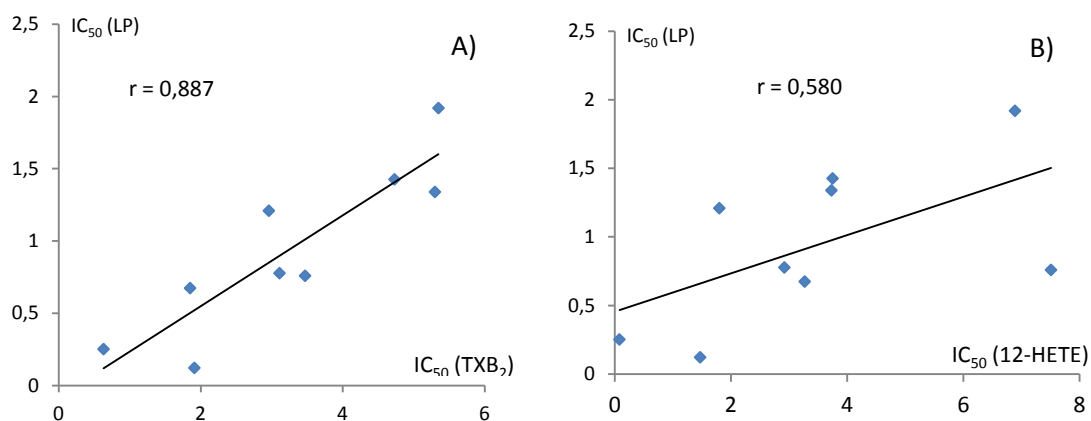


Slika 4.27. Grafici zavisnosti inhibicije produkcije 12-HHT, PGE₂, TXB₂ i 12-HETE od radne koncentracije ekstrakta vrsta *A. flavum* i *A. carinatum*



Slika 4.28. Grafici zavisnosti inhibicije produkcije 12-HHT, PGE2, TXB2 i 12-HETE od radne koncentracije ekstrakta vrsta *A. fuscum*, *A. melanatherum*, *A. rhodopeum*, *A. paniculatum*, *A. pallens*, *A. oleraceum*, *A. cepa* i *A. sativum*

Početne faze metabolizma arahidonske kiseline su zapravo reakcije lipidne peroksidacije i zbog toga je izvršen pokušaj korelacije aktivnosti dobijenih u testu inhibicije lipidne peroksidacije sa rezultatima testa antiinflamatorne aktivnosti (Slika 4.29). Ako se izuzmu rezultati za ekstrakt vrste *A. rhodopeum*, dobije se vrlo visok stepen korelacije (Pirsonov koeficijent (r) = 0,887) između IC_{50} vrednosti inhibicije LP i inhibicije COX enzima (produkcije TXB_2), što ukazuje na to da ispitivani ekstrakti roda *Allium* verovatno inhibiraju LP i aktivnost COX enzima na isti način, osim u slučaju ekstrakta vrste *A. rhodopeum*, koji je veoma slab inhibitor LP, a veoma snažan inhibitor COX-1, i najverovatnije ispoljava svoju antiinflamatornu aktivnost inhibirajući enzim fosfolipazu A_2 . Između IC_{50} vrednosti za inhibiciju LP i inhibiciju 12-LOX, koeficijent korelacije je znatno manji (r = 0,58) čak i kada se izuzme ekstrakt vrste *A. rhodopeum*, što ukazuje na veći broj mehanizama uključenih u inhibiciju 12-LOX nego u inhibiciju LP.



Slika 4.29. Grafik korelacije između IC_{50} vrednosti inhibicije lipidne peroksidacije i inhibicije produkcije TXB_2 (A) i grafik korelacije između IC_{50} vrednosti inhibicije lipidne peroksidacije i inhibicije produkcije 12-HETE

Iz svega navedenog može se zaključiti da ekstrakti ispitivanih vrsta lukova ispoljavaju inhibitorno delovanje na metabolizam arahidonske kiseline u trombocitima. Inhibitorno delovanje ispitivanih ekstrakata na enzime ciklooksigenaznog puta moglo bi biti od značaja u sprečavanju i lečenju bolesti koje nastaju kao posledica hronične inflamacije, s obzirom da su prostaglandini (PG) i tromboksani (TX), koji nastaju u ovom putu, značajni medijatori inflamatornih procesa (Smith, 1989). S druge strane, inhibitorno delovanje koje su ispitivani ekstrakti pokazali na trombocitnu 12-(S)-lipoksigenazu (12-(S)-LOX) može naći primenu u prevenciji i lečenju kancerogenih obolenja, s obzirom da je 12-(S)-LOX prekomerno ekspresovana u tkivima mnogih tumora (prostate, pankreasa, dojki, debelog creva i pluća) i ima ulogu u proliferaciji tumorskih ćelija, pospešuje adheziju i motilitet tumorskih ćelija i sekreciju proteinaze (Nie i Honn, 2002; Wong i drugi, 2001). 12-HETE, proizvod 12-LOX, ima ulogu i u razvoju psorijaze (Kragballe, Desjarlais, Duell, Voorhees, 1986), ateroskleroze (Nakao, Ooyama, Chang, Murota, Orimo, 1982) i reumatoidnog artritisa (Liagre, Vergne, Rigaud, Beneytout, 1997), pa inhibicija njegove produkcije može doprineti sprečavanju ovih bolesti.

4.4 ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKATA

4.4.1 Antibakterijska aktivnost ekstrakata

Poznato je da beli luk, prvenstveno zahvaljujući alicinu i drugim isparljivim sumpornim jedinjenjima ispoljava antibiotski efekat na širok spektar gram-(+) i gram-(-) bakterija (Elnima i drugi, 1983; Ankri i Mirelman, 1999; Amagase i drugi, 2001; Benkeblia, 2004; Ross i drugi, 2001; Bakri i Douglas, 2005; Ruddock i drugi, 2005, Delaha i Garagusi, 1985; Harris i drugi, 2001). Cni luk takođe pokazuje antimikrobnu aktivnost, ali znatno manju u poređenju sa belim lukom (Elnima i sar., 1983; Kim 1997; Benkeblia, 2004; Bakht i drugi, 2013; Hughes i Lawson, 1991; Santas i drugi, 2010). Pored ove dve najpoznatije vrste luka, i neki samonikli predstavnici tipične sekcije *Allium* sa teritorije Srbije (*A. scorodoprasum*, *A. rotundum*, *A. sphaerocephalon*, *A. vineale*, *A. guttatum* i *A. atrovioleaceum*) pokazali su snažno antibakterijsko delovanje na gram-pozitivne bakterije, dok na gram negativne nisu imali efekta (Božin, 2009).

Predstavnici sect. *Codonoprasum* do sada nisu bili ispitivani sa aspekta antibakterijskog delovanja, osim ekstrakata vrste *A. flavum*, čija je antibakterijska aktivnost ispitana na sedam vrsta bakterija mikrodilucionom metodom (Curcic i drugi, 2012). Ekstrakti vrste *A. flavum*, naročito etil-acetatni i acetonski ekstrakti cvasti, pokazali su antibakterijsku aktivnost na dve G⁺ bakterije (*Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis*) i dve G⁻ bakterije (*Pseudomonas aeruginosa* i *Salmonella typhimuriumi*).

U ovom radu, antibakterijska aktivnost metanolnih ekstrakata vrsta roda *Allium* sect. *Codonoprasum* ispitana je disk-difuzionom metodom na 8 bakterijskih sojeva: četiri referentna soja Gram pozitivnih bakterija (*Sarcina lutea* ATCC 9391, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P i *Bacillus subtilis* ATCC 10707) i četiri referentna soja Gram negativnih bakterija (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 i tri soja *Escherichia coli* ATCC 25922, SY 252 i IB 112 *lpcA*). Za ispitivanje su odabrani metanolni ekstrakti vrsta *A. flavum* (lokalitet Babušnica), *A. carinatum* subsp. *carinatum* (lokalitet Čemernik), *A. carinatum* subsp. *pulchelum* (lokalitet Vlasinsko jezero), *A. fuscum* subsp. *fuscum* (lokalitet Zaovine), *A. oleraceum* (lokalitet Kosmovac), *A. melanantherum* (lokalitet Plana), *A. rhodopeum* (lokalitet Dimitrovgrad), *A. pallens* (lokalitet Beli Rzav) i *A. paniculatum* (lokalitet Titelski breg). Kao pozitivna kontrola korišćeni su komercijalno proizvedeni diskovi kanamicina, penicilina, hloramfenikola i cefuroksima, dok je za *Pseudomonas aeruginosa*, s obzirom da je bio rezistentan na prethodna četiri antibiotika, urađen test i sa inertnim diskom impregniranim sa rastvorom karbenicilina. Rezultati disk-difuzionog testa za ispitivane antibiotike dati su u Tabeli 4.10.

Od svih ispitivanih ekstrakata, jedino je ekstrakt vrste *A. melanantherum* pokazao antibakterijsku aktivnost u disk-difuzionom testu i to samo prema soju *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Tabela 4.11.), dok kod ostalih ispitivanih ekstrakata nije detektovana zona inhibicije. Ispitivani soj *S. aureus* bio je osetljiv na sva četiri ispitivana antibiotika, a ekstrakt *A. melanantherum* u koncentraciji 4 mg/disku pokazao je približno istu zonu inhibicije kao antibiotici kanamicin (30 µg/disk) i hloramfenikol (70 µg/disk), dok su penicilin (100 IU/disk) i cefuroksim (100µg/disk) pokazali još izraženiju antibakterijsku aktivnost. Antibakterijska aktivnost ekstrakta vrste *A. melanantherum* može se objasniti izuzetno visokim sadržajem rutina u ovom ekstraktu, za koji je ranije dokazano da ispoljava antimikrobno delovanje naročito prema *Staphylococcus aureus* (Alvarez i drugi, 2006). Antibakterijska aktivnost dokazana je i za mnoge druge flavonoide, npr. kvercetin, kvercetin-3-O-glukozid, kemferol-3-O-glukozid, luteolin-7-O-glukozid, apigenin (Akroum i drugi, 2009), međutim njihova koncentracija u ispitivanim ekstraktima očito nije dovoljno velika da bi ispoljili baktericidnu aktivnost.

Tabela 4.10. Rezultati disk-difuzionog testa za ispitivane antibiotike

Bakterijski soj	Prečnik zone inhibicije (mm)				
	kanamicin 30 µg/disk	hloramfenikol 70 µg/disk	penicilin 100 IU/disk	cefuroksim 100 µg/disk	karbenicilin* 100µg/disk
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0	10	0	0	18
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 10707	29	25	17	0	-
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9391	34	25	11	0	-
<i>Escherichia coli</i> SY 252	25	20	20	0	-
<i>Escherichia coli lpc</i>	26	13	12	17	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	12	20	12	18	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	22	20	30	26	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	30	10	0	0	-

*Test sa karbenicilinom urađen samo za *Pseudomonas aeruginosa*

Tabela 4.11. Rezultati disk-difuzionog testa za ekstrakt vrste *A. melanatherum*

Bakterijski soj	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538			
C (mg/disku)	4	2	1	0,5
	25	20	16	15
PZI (mm)*	20	18	18	16
	19	19	16	15
PZI_{sr} (mm)**	21,3 ± 3,2	19,0 ± 1,0	16,7 ± 1,2	15,3 ± 0,6

*PZI – prečnik zone inhibicije

**PZI_{sr} - srednja vrednost za tri ponavljanja ± standardna devijacija

U cilju određivanja minimalne baktericidne koncentracije (MBC), ekstrakt vrste *A. melanatherum* podvrgnut je daljem testiranju. Za određivanje MBC korišćena je diluciona metoda u epruvetama (Hindler, 1995). Ekstrakt je testiran u rasponu koncentracija od 3,85 – 30,8 mg suvog ekstrakta po mL hranjive podloge u kojoj se nalazilo $1,5 \times 10^7$ bakterija/mL soja *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Rezultati su prikazani u Tabeli 4.12. Iz epruveta sa najnižom koncentracijom ekstrakta pri kojoj nije došlo do zamućenja ($15,4 \text{ mg mL}^{-1}$), zasejane su kulture na LA podlogu i nakon inkubacije od 24 h na 37 °C nije došlo do rasta bakterija, čime je potvrđeno da ova koncentracija odgovara minimalnoj baktericidnoj koncentraciji (MBC).

Tabela 4.12. Rezultati ispitivanja MBC na soju *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Ekstrakt	<i>A. melanatherum</i>											
C (mg/ml)	30,8			15,4			7,69			3,85		
Zamućenost	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
MBC				+								

Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da 70% MeOH ekstrakti ispitivanih vrsta roda *Allium* sect. *Codonoprasum* nisu pokazali antibakterijsku aktivnost u disk-difuzionom testu na ispitivane G⁺ i G⁻ bakterije u koncentracijama do 4 mg mL⁻¹, izuzev ekstrakta vrste *A. melanatherum* koji je pokazao slabu antibakterijsku aktivnost na *Staphylococcus aureus*.

4.4.2. Antiviralna aktivnost ekstrakata

U cilju ispitivanja antiviralnog efekta biljnih ekstrakata koriste se najčešće animalni i biljni virusi, ali i virusi bakterija, koji služe kao model organizmi za druge viruse. U ovom radu kao model virusi korišćeni su bakteriofag δ koji pripada porodici *Podoviridae* i fag σ -1 iz porodice *Siphoviridae* (Knežević i drugi, 2009). Oba bakteriofaga spadaju u red *Caudovirales*, i kao pripadnici pomenutih porodica sastoje se od dvolančane DNK i proteinskog omotača.

Rezultati ispitivanja antiviralnog efekta odabranih 70% MeOH ekstrakata vrsta roda *Allium* pokazuju odsustvo antiviralne aktivnosti na 37°C u toku 30 min u ispitivanom opsegu koncentracija. PhI_{50} za sve ispitivane ekstrakte bio je veći od maksimalne ispitivane koncentracije, tj. od 40 mg mL⁻¹ (Tabela 4.13.). Pošto korišćeni bakteriofagi imaju dsDNK i ne poseduju lipide u svom sastavu, rezultati ukazuju da ispitivani ekstrakti ne bi imali efekat ni na animalne dsDNK viruse bez omotača (porodice *Papillomaviridae*, *Poliomaviridae*, *Adenoviridae*, *Iridoviridae*). Antiviralni efekat standarda kvercetin rastvorenog u metanolu u koncentraciji od 2 mg mL⁻¹ takođe nije utvrđen, ali je kvercetin rastvoren u DMSO-u redukovao brojnost vijabilnih faga na polovinu u koncentraciji od 0,108 mg mL⁻¹. Verovatno je razlog dobijanja ovakvih rezultata mnogo bolja rastvorljivost kvercetin u DMSO nego u metanolu. Međutim, PhI_{50} vrednost od 108 μ g mL⁻¹ je relativno visoka, zbog čega se efekat kvercetin na ovaj virus može smatrati slabim.

Tabela 4.13. Antiviralna aktivnost odabranih metanolnih ekstrakata vrsta roda *Allium* i standarda kvercetin

Antiviralni agens	PhI_{50} * (mg mL ⁻¹)	
	Bakteriofagi	
	σ -1	δ
<i>A. fuscum</i> subsp. <i>fuscum</i> , Zaovine	> 40	> 40
<i>A. paniculatum</i> , Titelski breg	> 40	> 40
<i>A. rhodopeum</i> , Dimitrovgrad	> 40	> 40
<i>A. melantherum</i> , Čemernik	> 40	> 40
<i>A. cepa</i> , Neradin	> 40	> 40
<i>A. sativum</i> , Šajkaš	> 40	> 40
Kvercetin/MetOH	> 2	> 2
Kvercetin/DMSO	> 2	0,108**

* PhI_{50} - koncentracija koja inaktivira, tj. smanjuje brojnost viriona na pola

**R=0,954; P=0,045; N=5

Dosadašnja saznanja o antiviralnoj aktivnosti ekstrakata pripadnika roda *Allium* baziraju se prvenstveno na rezultatima dobijenim za vodene ili etanolne ekstrakte vrsta *A. sativum* i *A. cepa*. *A. sativum* deluje na Y virus krompira (Mohamed, 2010), etanolni ekstrakt lukovica na virus infektivne bolesti burze (Meenakshi i drugi, 2009), HSV-1, HSV-2, virus parainfluence tip 3, virus vakcinije, virus vezikularnog stomatitisa (VSV), humani rinovirus tip 2 (Weber i drugi, 1992), kao i na adenoviruse (Chen i drugi, 2011). Detaljna istraživanja pokazala su da ajoin iz *A. sativum* ima najveću antiviralnu aktivnost, a zatim i alicin, alil-metil-tiosulfat, metil-alil-tiosulfat (Weber i drugi, 1992) i kvercetin (Chen i drugi, 2011). Ostala jedinjenja polarne frakcije ekstrakata, koja se sastojala od aliina, deoksialiina, dialil-disulfida i dialil-trisulfida, nije imala virucidan efekat (Weber i drugi, 1992). Slični rezultati dobijeni su i za etanolne ekstrakte *A. cepa* kada je u pitanju Y virus krompira (Mohamed, 2010), slabiji efekat utvrđen je na adenoviruse (Chen i drugi, 2011), a antiviralni efekat na virus slinavke i šapa nije utvrđen (Chungsamarnyart i drugi, 2007). Od ostalih pripadnika ovog roda zanimljivo je spomenuti i *A. ascalonicum*, koji je imao izuzetno antiviralno delovanje, kao i *A. porrum* i *A. fistulosum*, koji su pokazali slab virucidan efekat (Chen i drugi,

2011). Etanolni ekstrakt vrste *A.schoenoprasum* sa područja Malezije nije pokazao antiviralni efekat na HSV-1 i VSV (Ali i drugi, 1996).

Ekstrakti pripadnika sect. *Codonoprasum* (*A. fuscum*, *A. paniculatum*, *A. rhodopeum* i *A.melantherum*), ispitivani u ovom radu, ranije nisu proučavani kao potencijalni izvor antiviralnih agenasa. Takođe, efekat ekstrakata pripadnika roda *Allium* nije prethodno ispitivan na bakteriofage.

U ranijim istraživanjima dokazano je da derivati kvercetina pokazuju generalno veću antiviralnu efikasnost u odnosu na aglikon kvercetin. Tako je utvrđen izuzetno jak antiviralni efekat kvercetin-7-ramnozida ($PhI_{50}=0,014 \mu\text{g mL}^{-1}$) na svinjski dijarealni virus (Choi i drugi, 2009). Izokvecetin je pokazao oko 50 puta veću antiviralnu aktivnost na virus gripa od kvercetina (Kim i drugi, 2010). Dobar antiviralni efekat na influenza A virus utvrđen je i za derivat kvercetin-3-O- β -D-glukuronid (Fan i drugi, 2011), dok je kvercetin 3-O-(2''-galoil)- α -L-arabinopiranozid pokazao inhibitorni efekat na enzim integrazu HIV-a (Fesen i drugi, 1993). Rutin se pokazao kao potentan inhibitor HSV-1 (Orhan i drugi, 2010). Sam mehanizam delovanja kvercetina i njegovih derivata nije do detalja ispitan. Selway (1986) je pretpostavio da flavonoidi inhibiraju virusne enzime, tačnije virusnu polimerazu i da se vezuju za virusni kapsid i nukleinske kiseline. Do sada je dokazano da je antiviralni efekat kvercetina rezultat smanjenja adsorpcije virusa za ćeliju i multiplikacije u ćeliji (Kaul i drugi, 1985), dok se efekat na ekstracelularne viruse može pripisati njegovoj aktivnosti u prekidanju jednolančane i dvolančane DNK u prisustvu jona bakra (Cu^{2+}) ili gvožđa (Fe^{3+}) (Rahman i drugi, 1989). Međutim iako je prisustvo kvercetina i njegovi glikozida dokazano u ekstraktima ispitivanim u ovom radu, njihova koncentracija očito nije dovoljno velika da bi dovela do inaktivacije faga.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su ispitivani ekstrakti vrsta roda *Allium* i standard kvercetin pokazali slab efekat na inaktivaciju bakteriofaga. Ipak, ne treba izgubiti iz vida mogućnost da bi ekstrakti ili čiste supstance pokazale efekat na proces multiplikacije virusa u animalnim ćelijama, što je još jedan od mogućih načina njihovog delovanja, a koje nije ispitano u ovom radu.

4.5 ANTIMUTAGENA AKTIVNOST EKSTRAKATA

Za širok spektar jedinjenja sa antioksidantnom aktivnošću (vitamini, fenolna jedinjenja, terpenoidi, sumporna jedinjenja), dokazano je da inhibiraju ili moduliraju delovanje mutagena i kancerogena iz spoljašnje sredine. Prirodni antioksidansi i njihovi metaboliti mogu da deluju na mutagenezu i na početni korak kancerogeneze preko nekoliko dezmutagenih mehanizama, kao što su hvatanje reaktivnih kiseoničnih vrsta, inhibicija enzima uključenih u metaboličke transformacije mutagena ili inhibicija vezivanja mutagena za DNK (Nikolić i drugi, 2012; Guyonnet i drugi, 2001).

Dokazano je da organosumporna jedinjenja prisutna u lukovima imaju zaštitnu ulogu od hemijskih kancerogena zahvaljujući svojoj antioksidantnoj aktivnosti i sposobnosti da inhibiraju enzime koji aktiviraju kancerogene (familija citohrom P450 enzima) (Bianchini i Vainio, 2001; Fleischauer i Arab, 2001; Milner, 2001; Chun i drugi, 2001). Pored toga, ova jedinjenja imaju i sposobnosti da indukuju enzime za detoksikaciju kancerogena, kao što su glutation-S-transferaza (GSH-(S)T), epoksid hidrolaza i glukuronil transferaza (Munday i Munday, 1999; Bianchini i Vainio, 2001; Thomson i Ali, 2003). U eksperimentima na pacovima dokazano je da i rutin ispoljava hemopreventivne osobine, zaustavljajući kancerogenezu indukovanu heterocikličnim aminima (Hirose i drugi, 1999). Takođe je dokazano da kvercetin smanjuje genotoksičnost

indukovanu aromatičnim aminima na taj način što inhibira aktivnost CYP1A2, koji je uključen u bioaktivaciju ovog kancerogena (Lautraite i drugi, 2002).

U ovom radu antimitagena aktivnost ekstrakata vrsta roda *Allium* ispitivana je merenjem njihovog protektivnog delovanja na oksidativnu mutagenezu u bakteriji *Escherichia coli* WP2. Korišćen je reverzno-mutacijski test, koji se preporučuje za skrining oksidacionih mutagena (Blanco i drugi, 1998). Kao test organizam korišćen je soj IC202, koji je *oxyR* mutant, tj. ne sadrži *oxyR* gen, zbog čega nema sposobnost uklanjanja ROS, pa je pogodan za detekciju antimitagenog potencijala antioksidanasa. *oxyR* protein je redoks-senzitivni transkripcioni aktivator gena koji kodiraju antioksidantne enzime: katalazu, hidroksiperoksidazu I, alkilhidroperoksid reduktazu, glutation reduktazu. Kao jak oksidacioni mutagen koji indukuje oksidativni stres i pokreće reparacionu mutagenezu korišćen je *tert*-butil-hidroperoksid (*t*-BOOH). Mutagenezu je praćena preko *trpE65*→Trp⁺ reverzije. Broj Trp⁺ revertanata proporcionalan je jačini oksidacionog mutagena, a obrnuto proporcionalan jačini antimitagenog agensa (Blanco i drugi, 1998; Urios i drugi, 1995). Inhibitorni efekat na *t*-BOOH-indukovanu mutagenezu ispitivan je u postupku kotretmana ekstraktima i trebalo je da odgovori na pitanje da li ekstrakti mogu da inhibiraju oksidativnu mutagenezu zahvaljujući svojim sposobnostima hvatanja ROS.

S obzirom da se u ovom eksperimentu troši izrazito velika količina hemikalija i potrošnog materijala, odabrana su samo tri ekstrakta vrsta sect. *Codonoprasum* za ispitivanje antimitagene aktivnosti, i to ekstrakti nadzemnih delova vrsta *A. melanatherum* i *A. flavum* subsp. *flavum* jer sadrže najveću količinu fenolnih jedinjenja i ekstrakt nadzemnih delova vrste *A. carinatum* subsp. *carinatum* zbog visokog sadržaja antocijana.

U prvom delu eksperimenta ispitana je toksičnost 70% metanolnih ekstrakata na testirani bakterijski soj *E. coli* IC202, na LA i ET4 podlogama. Rezultati određivanja toksičnosti ekstrakata prikazani su u Tabelama 4.14. i 4.15. Iz dobijenih rezultata se vidi da ni jedan od tri ispitivana ekstrakta u koncentracijama 0,1- 4,0 mg po petri šolji ne pokazuje toksični efekat na rast bakterije *E. coli* IC202, pa su ove koncentracije primenjene i u testu antimitagene aktivnosti. Ispitana je i toksičnost korišćenog rastvarača MeOH i utvrđeno je da ne ispoljava toksični efekat u primenjenoj koncentraciji.

Tabela 4.14. Rezultati ispitivanja toksičnosti ekstrakata na *E. coli* IC202 na LA podlozi

ekstrakt koncentracija (mg/petri šolji)	<i>A. flavum</i>		<i>A. melanatherum</i>		<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i>	
	broj preživelih ćelija	srednja vrednost	broj preživelih ćelija	srednja vrednost	broj preživelih ćelija	srednja vrednost
0	10 9	9	10 9	9	7 44	25
MeOH	33 50	41	33 50	41	43 31	37
0,1	62 74	68	- -	-	35 61	48
0,25	5 25	15	39 15	27	- -	-
0,5	16 45	30	- -	-	40 13	26
0,75	15 8	11	33 43	38	5 12	8
1,5	30 1	15	22 13	17	26 35	30
4,0	23 16	19	20 14	17	38 29	33

Tabela 4.15. Rezultati ispitivanja toksičnosti ekstrakata na *E. coli* IC202 na ET4 podlozi

ekstrakt Koncentracija (mg/petri šolji)	<i>A. flavum</i>		<i>A. melanatherum</i>		<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i>	
	broj preživelih ćelija	srednja vrednost	broj preživelih ćelija	srednja vrednost	broj preživelih ćelija	srednja vrednost
0	28	22	28	22	16	18
	17		17		20	
MeOH	13	13	13	13	24	22
	13		13		21	
0,1	53	43	47	48	21	20
	34		50		20	
0,25	55	47	54	46	-	-
	39		38		-	
0,5	58	52	50	48	27	24
	46		47		22	
0,75	41	47	47	43	26	23
	54		39		21	
1,5	55	61	48	46	19	19
	68		45		19	
4,0	39	43	40	46	17	18
	48		52		20	

Rezultati određivanja antimutagenog efekta ekstrakata vrsta roda *Allium* na spontanu i *t*-BOOH indukovanu mutagenezu u *E. coli* IC202 dati su u Prilogu 8.9 (Tabele 8.57. i 8.58.) i u Tabelama 4.16. i 4.17.

Tabela 4.16. Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata na spontanu mutagenezu u *E. coli* IC202

ekstrakt Koncentracija (mg/petri šolji)	<i>A. flavum</i>		<i>A. melanatherum</i>		<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i>	
	broj Trp ⁺	Inhibicija mutageneze (%) [*]	broj Trp ⁺	Inhibicija mutageneze (%) [*]	broj Trp ⁺	Inhibicija mutageneze (%) [*]
0	36±8	/	36±8	/	36±8	/
MeOH	41±5	-14 ^{**}	41±5	-14 ^{**}	41±5	-14 ^{**}
0,1	26±2	38	34±1	17	48±12	-17
0,5	47±6	-15	59±5	-43	58±21	-41
1,0	40±8	24	40±0	2	58±4	-41
4,0	42±13	-2	40±15	2	57±16	-39

^{*} % inhibicije mutageneze računat u odnosu na kontrolu sa rastvaračem

^{**} % inhibicije mutageneze računat u odnosu na kontrolu bez rastvarača

Tabela 4.17. Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata na *t*-BOOH indukovanu mutagenezu u *E. coli* IC202

ekstrakt Koncentracija (mg/petri šolji)	<i>A. flavum</i>		<i>A. melanatherum</i>		<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i>	
	broj Trp ⁺	Inhibicija mutageneze (%) [*]	broj Trp ⁺	Inhibicija mutageneze (%) [*]	broj Trp ⁺	Inhibicija mutageneze (%) [*]
0	71±17	/	71±17	/	71±17	/
MeOH	60±3	15 ^{**}	60±3	15 ^{**}	60±3	15 ^{**}
0,1	49±10	18	59±10	2	55±15	8
0,5	40±5	33	52±12	13	65±4	-8
1,0	62±4	-3	68±8	-13	77±7	-28
4,0	65±9	-8	62±22	-20	64±14	-7

^{*} % inhibicije mutageneze računat u odnosu na kontrolu sa rastvaračem

^{**} % inhibicije mutageneze računat u odnosu na kontrolu bez rastvarača

Iz prikazanih rezultata se vidi da je *t*-BOOH povećao broj Trp⁺ revertanata u kontroli za 30%. Rastvarač (MeOH) u primenjenim koncentracijama (10 µL po petri šolji) nije imao uticaj na intenzitet mutageneze. Takođe, ekstrakti vrsta *A. flavum* i *A. melanantherum* u ispitivanom opsegu koncentracija (0,1 – 4 mg po petri šolji) nisu ispoljili značajniji antimutageni efekat ni na spontanu ni na indukovanu mutagenezu. Ekstrakt vrste *A. flavum* je pri nižim koncentracijama (0,1 i 0,5 mg/pš) pokazao slab antimutageni efekat na indukovanu mutagenezu (inhibicija mutageneze 18% i 33%, respektivno) i na taj način inhibirao delovanje *t*-BOOH. Međutim, pri višim koncentracijama ekstrakta ovaj efekat nije zabeležen. Ovakav rezultat ukazuje da veće koncentracije ekstrakta u prisustvu *t*-BOOH mogu čak delovati prooksidantno. U literaturi postoji čitav niz primera jedinjenja koja pokazuju antioksidantni efekat pri nižim, a prooksidantni efekat pri višim koncentracijama (Babich i drugi, 2002, 2011; Bellion i drugi, 2009; Long i drugi, 2000). Tako neki polifenoli mogu da podlegnu procesu autooksidacije pri čemu generišu semihinon radikal, koji podleže neenzimskoj redukciji sa NADH, što rezultuje produkcijom viška ROS (Long i drugi, 2000). Zbog toga bi eventualna primena ekstrakta nadzemnih delova vrste *A. flavum* morala biti ograničena na niže koncentracije. Ekstrakt vrste *A. carinatum* subsp. *carinatum*, takođe nije pokazao antimutageni efekat, već je delovao slabo promutageno i na sponatnu i na indukovanu mutagenezu.

U ovom radu ispitan je samo jedan aspekt antimutagenog delovanja, tj. sposobnost ekstrakata da neutrališe reaktivne slobodne radikale koji nastaju u reakciji *t*-BOOH sa ćelijskim enzimima (najverovatnije enzimima respiratornog niza, Kennedy i drugi, 1992). Da bi se ispitan drugi mogući mehanizam antimutagenog delovanja – sposobnost ekstrakata da moduliraju ćelijske procese detoksifikacije, kao što je povećanje aktivnosti antioksidantnih enzima i povećanje koncentracije neenzimskih endogenih antioksidanasa, u narednim fazama istraživanja trebalo bi uraditi eksperimente sa pretretmanom, gde bi se pre dodatka mutagena vršila inkubacija bakterija sa ekstraktom. U prilog potrebi za ovim ispitivanjem ide i činjenica da je za neke druge vrste roda *Allium* dokazana sposobnost idukcije enzimske antioksidantne odbrane organizma (El-Demerdash i drugi, 2005; Thomson i Ali, 2003).

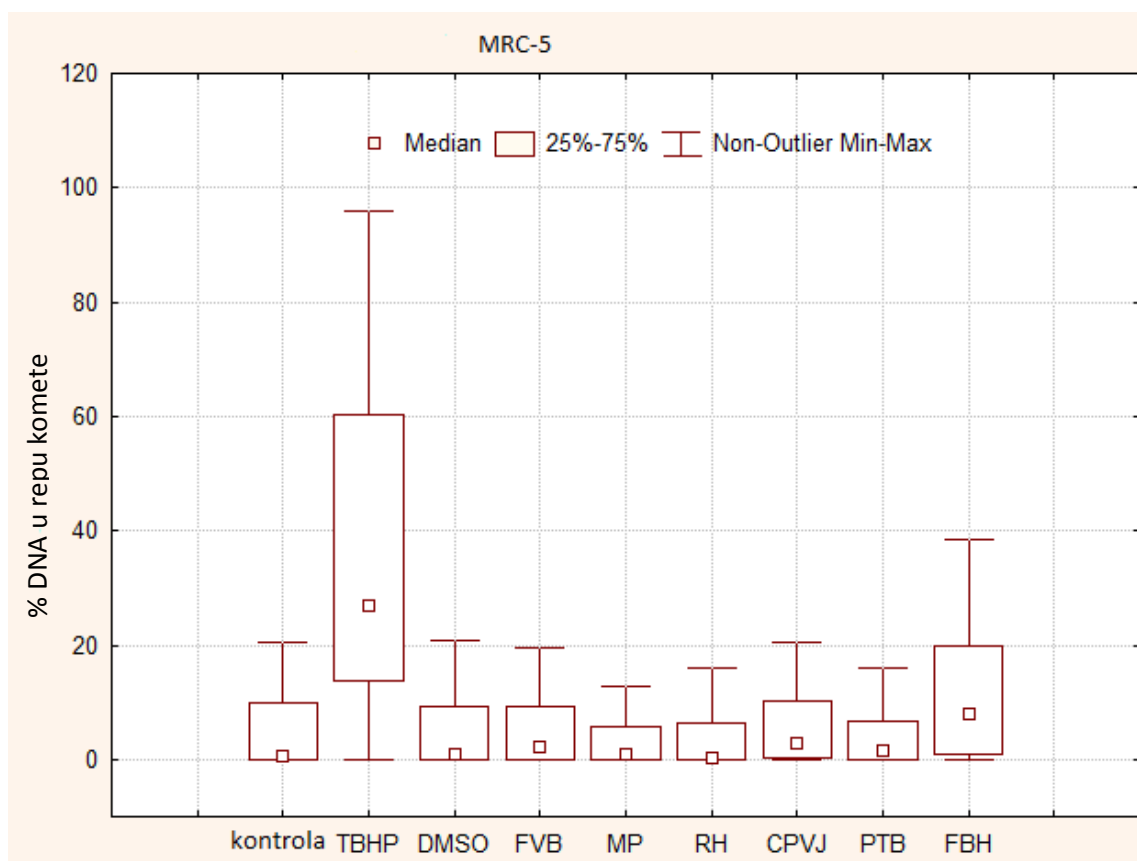
7.10. GENOTOKSIČNI EFEKAT EKSTRAKATA

U ranijim eksperimentima ispitan je genotoksični efekat organosumpornih jedinjenja lukova, pri čemu je utvrđeno da ne samo da ne pokazuju genotoksični efekat na određene humane i životinjske ćelije, već da sprečavaju genotoksični efekat različitih kancerogena (aflatoksin B1, benzo[*a*]piren, stiren-oksidi, 4-nitrohinolin-1-oksidi) (Guyonnet i drugi, 2001; Belloir i drugi, 2006). Takođe je dokazano da dialil-disulfid, dominantno sumporno jedinjenje belog luka, dovodi do povećane produkcije ROS, čime indukuje apoptozu preko mitohondrijalnog puta u ćelijama neuroblastoma (SH-SY5Y) (Filomeni i drugi, 2003). Međutim, o potencijalnom genotoksičnom delovanju vrsta roda *Allium* sect. *Codonoprasum* do sada nema literaturnih podataka.

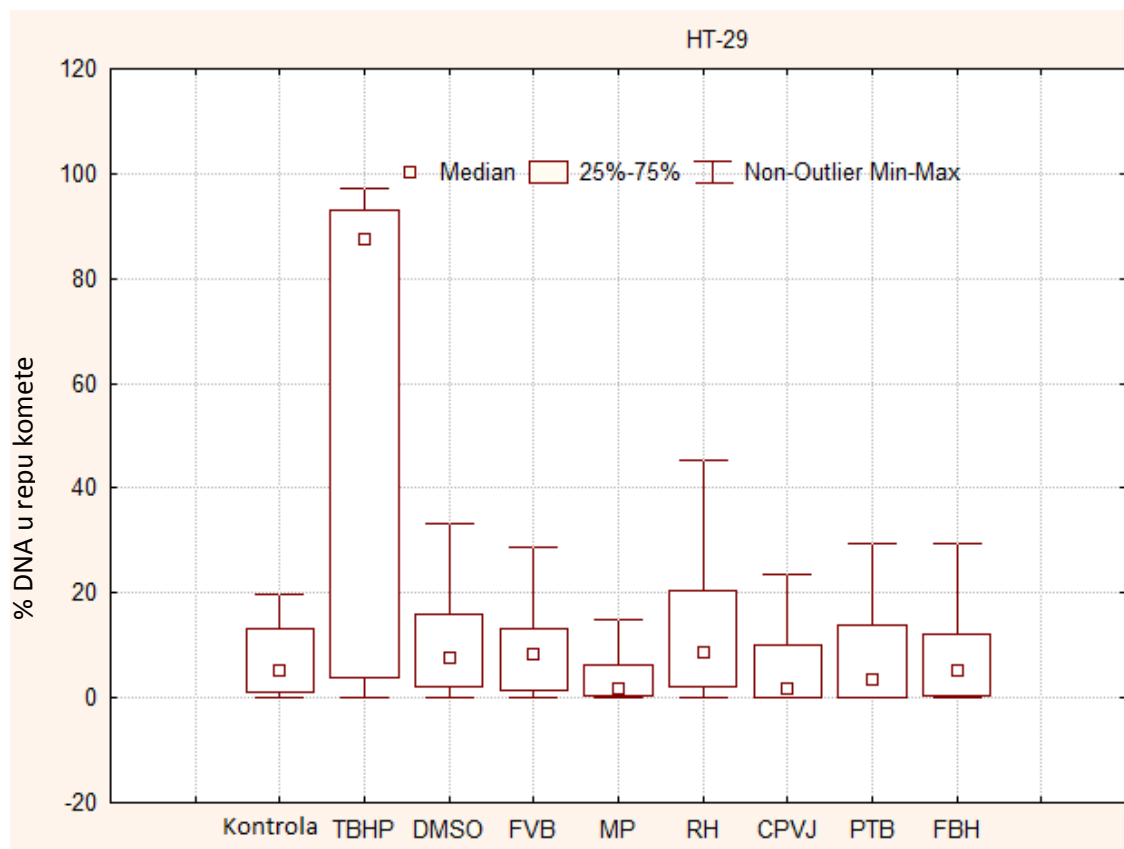
S obzirom da su u ovom radu prilikom ispitivanja uticaja na spontanu i indukovanu mutagenezu u *E. coli* IC202, dobijeni rezultati koji ukazuju na moguće prooksidantno delovanje pojedinih ekstrakata, u sledećoj fazi istraživanja ispitan je potencijalni genotoksični efekat ovih ekstrakata na zdrave humane fibroplaste pluća (Human fetal lung fibroblast cells – MRC-5), kako bi se proverila bezbednost njihove eventualne upotrebe u humanoj medicini. Takođe, ispitan je potencijal ekstrakata da deluju kao genotoksični agensi na humane ćelije karcinoma debelog creva (Human colon adenocarcinoma grade II cell line – HT-29), jer bi to mogao biti jedan od

mehanizama citotoksičnog delovanja na ćelije raka. Za detekciju DNK oštećenja korišćena je elektroforeza pojedinačnih ćelija u agaroznom gelu ili alkalni komet test (Singh i drugi, 1988; Nikolic i drugi, 2011). Slike 50 nasumično odabranih ćelija analizirane su pomoću odgovarajućeg kompjuterskog programa, a % DNK u repu komete korišćen je kao merilo broja prekida DNK lanaca. Genotoksični efekat meren je nakon 20 h inkubacije ćelija sa ekstraktima celih biljaka vrsta *A. flavum* (FVB), *A. melanatherum* (MP), *A. rhodopeum* (RH), *A. carinatum* subsp. *pulchelum* (CPVJ), *A. paniculatum* (PTB) i ekstraktom nadzemnih delova vrste *A. flavum* (FBH), u koncentracijama pri kojima je preživljavanje ćelija oko 80%.

Dobijeni rezultati dati su u *Prilogu 8.10* (Tabele 8.59. i 8.60.) i na *Slici 4.30*. Iz prikazanih rezultata se vidi da je oksidujućii genotoksićni agens *t*-butil-hidroperoksid, koji je korišćen kao pozitivna kontrola, dao jasan pozitivan odgovor u primenjenoj koncentraciji ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) i na taj naćin demonstrirao osetljivost komet testa. Većina ekstrakata, kao i rastvarać DMSO, nisu doveli do oštećenja DNK u ispitivanim ćelijskim linijama (dobijene srednje vrednosti % DNA u repu komete slične onima za negativnu kontrolu, *Slika 4.30*). Međutim, ekstrakt nadzemnih delova vrste *A. flavum* (FBH) u koncentraciji od $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ pokazao je slab genotoksićni efekat na zdrave fibroplaste pluća ($p < 0,05$), dok u ćelijama adenokarcinoma debelog creva nije izazvao prekide DNK lanaca (*Slika 4.30*). Ovo ukazuje na oprez u slućaju eventualne primene ovog ekstrakta u medicinske svrhe i neophodnost strogog definisanja njegove maksimalne dozvoljene doze. S druge strane, rezultati dobijeni za ostale ispitivane ekstrakte ukazuju da je njihovo korišćenje bezbedno u koncentracijama nićim od ispitivanih.



Slika 4.30. Genotoksićni efekat ispitivanih ekstrakata (% DNA u repu komete) na MRC-5 ćelije. TBPH – kontrola sa *t*-BOOH, FVB – *A. flavum* cela biljka, MP – *A. melanatherum* cela biljka, RH – *A. rhodopeum* cela biljka, CPVJ – *A. carinatum* subsp. *pulchelum* cela biljka, PTB – *A. paniculatum* cela biljka, FBH – *A. flavum* nadzemni delovi



Slika 4.31. Genotoksični efekat ispitivanih ekstrakata (% DNA u repu komete) na HT-29 ćelije. TBPH – kontrola sa *t*-BOOH, FVB – *A. flavum* cela biljka, MP – *A. melanatherum* cela biljka, RH – *A. rhodopeum* cela biljka, CPVJ – *A. carinatum* subsp. *pulchelum* cela biljka, PTB – *A. paniculatum* cela biljka, FBH – *A. flavum* nadzemni delovi

S obzirom da ispitivani ekstrakti nisu ispoljili genotoksični efekat na HT-29 ćelije, može se smatrati da za potencijalni citotoksični efekat ovih ekstrakata na tumorske ćelije ne mogu biti odgovorni prekidi DNK lanaca, već da se indukcija ćelijske smrti u ovim ćelijama sigurno odvija nekim drugim mehanizmom.

Ono što nije ispitano u ovom radu, a što bi trebalo ispitati u narednim fazama istraživanja jeste da li ovi ekstrakti imaju preventivno delovanje na kancerogenezu, tj. da li u eksperimentima sa pre- i ko-tretmanom pokazuju zaštitno delovanje od hemijskih genotoksičnih agenasa i da li imaju uticaja na aktivnost detoksifikacionih enzima.

4.6 UTICAJ EKSTRAKATA VRSTA RODA *ALLIUM* NA RAST ZDRAVIH I TUMORSKIH ČELIJA I DETEKCIJA TIPA ČELIJSKE SMRTI

Brojna istraživanja potvrdila su da mnoge vrste roda *Allium*, pored hemopreventivnog delovanja, ispoljavaju i citotoksični efekat prema različitim tipovima tumorskih ćelija, i to preko nekoliko mehanizama delovanja: inhibicijom ćelijskog rasta (zaustavljanjem ćelijskog ciklusa), stimulacijom imunog odgovora ćelije i indukcijom apoptoze. Smatra se da su za ove efekte prvenstveno odgovorna sumporna jedinjenja lukova (Sakamoto i drugi, 1997; Votto i drugi, 2010; Tapiero i drugi, 2004; Li i drugi, 2002; Filomeni i drugi, 2003; Nakagawa i drugi, 2001; Robert i drugi, 2001; Xiao i drugi, 2004; Wu i drugi, 2011; Oommen i drugi, 2004; Park i drugi, 2007; Kim i drugi, 2008; Lee i drugi 2009). Glavni mehanizam putem koga ova jedinjenja ispoljavaju antiproliferativno delovanje je zaustavljanje ćelijskog ciklusa u G2/M fazi (Tapiero i drugi, 2004), što je praćeno indukcijom apoptoze preko kaspaza-zavisnog i kaspaza-nezavisnog puta (Filomeni i drugi, 2003; Sundaram i Milner, 1996a; Dirsch i drugi, 1998; Knowles i Milner, 1998; Sigounas i drugi, 1997; Hong i drugi, 2000). Pored toga, nepolarni ekstrakti nekih vrsta lukova snažno inhibiraju enzim sintazu masnih kiselina (FAS) u tumorskim ćelijama (Sun i Tian, 2009), što dovodi do nagomilavanja malonil-CoA, koji je okidač apoptoze (Wang i drugi, 2012). Najnovija istraživanja pokazala su da i polifenoli izolovani iz crnog luka inhibiraju rast ćelija humane leukemije putem ekstracelularne i intracelularne indukcije kaspaza-zavisne apoptoze (Han i drugi, 2013; Fu, 2004). Tako kvercetin inhibira rast i indukuje apoptozu u ćelijama leukemije, preko modulacije produkcije TCF- β -1, inhibicije DNK sinteze, inhibicije fosforilaze C i protein kinaze, i zaustavlja ćelijsku deobu u G1 fazi (Uddin i Choudhry, 1995; Yoshida i drugi, 1990; Rong i drugi, 2000). Kvercetin inhibira i DNK-metiltransferaze (DNMT), koje su izrazito aktivne u nekim tumorskim ćelijama (Lee i drugi, 2005). U citotoksična jedinjenja spadaju i steroidni saponini izolovani iz nekih vrsta lukova (Keusgen, 2002a; Mimaki i drugi, 1999; Amagase, 2006), kao i organo-Se jedinjenja, koja takođe značajno doprinose antitumorskoj aktivnosti crnog i belog luka (El-Bayoumy i drugi, 2006).

Antiproliferativna aktivnost prema ćelijama humanog kolorektalnog karcinoma (HCT-116) dokazana je i za metanolni ekstrakt nadzemnih delova vrste *A. flavum* (Curcic i drugi, 2012), dok su tri nova saponina tipa spirostana, izolovana iz ove biljke, pokazala umerenu citotoksičnost prema humanim kolorektalnim kancer ćelijama (SW480) (Rezgui i drugi, 2014). Ostale vrste sekcije *Codonoprasum* nisu do sada ispitivane u pogledu antitumorske aktivnosti.

U ovom radu ispitana je antiproliferativna aktivnost metanolnih ekstrakata celih biljaka i ekstrakata nadzemnih delova (herbae) vrsta *A. flavum* subsp. *flavum*, Babušnica (FB), *A. melanantherum*, Plana (MP), *A. carinatum* subsp. *carinatum*, Čemernik (CC), *A. rhodopeum*, Dimitrovgrad (RH), *A. carinatum* subsp. *pulchelum*, Vlasinsko jezero (CP), *A. paniculatum*, Titelski breg (PT), *A. fuscum* subsp. *fuscum*, Zaovine (FF), *A. pallens*, Beli Rzav (PL), *A. oleraceum*, Kosmovac (OK), *A. cepa*, Neradin (AC) i *A. sativum*, Šajkaš (AS) prema jednoj zdravoj (fetalni fibroplasti pluća – MRC-5) i tri tumorske ćelijske linije (epitelni karcinom cerviksa – HeLa, adenokarcinom dojke – MCF7, adenokarcinom debelog creva – HT-29). U svrhu poređenja rezultata uporedo sa ekstraktima ispitani su i komercijalni lekovi koji se koriste u hemoterapiji kancera Gemzar® i Doxorubicin®. U cilju korelacije aktivnosti ekstrakata sa njihovim sastavom i identifikacije aktivnih principa, ispitana je i aktivnost standardnih jedinjenja – ferulne i kafene kiseline i flavonoida kvercetina, kemferola i rutina, čiji sadržaj u ekstraktima je prethodno određen. Za određivanje intenziteta ćelijskog rasta korišćen je sulforhodamin B (SRB) test (Skehan i drugi, 1990). Antiproliferativna aktivnost izražena je kao IC₅₀ vrednost (koncentracija ekstrakta/standarda pri kojoj je ćelijski rast inhibiran za 50 %). Takođe je izračunat i ne-tumor/tumor odnos (NT/T),

koji predstavlja odnos između IC_{50} vrednosti dobijenih za ne-tumorsku i tumorske ćelijske linije, pri čemu vrednosti NT/T iznad 1 odgovaraju većoj aktivnosti u tumorskoj ćeliji u odnosu na zdravu. Dobijeni rezultati prikazani su u *Prilogu 8.11 (Tabele 8.61.-8.77.)*, u *Tabeli 4.18.* i na *Slikama 4.32-4.35.*

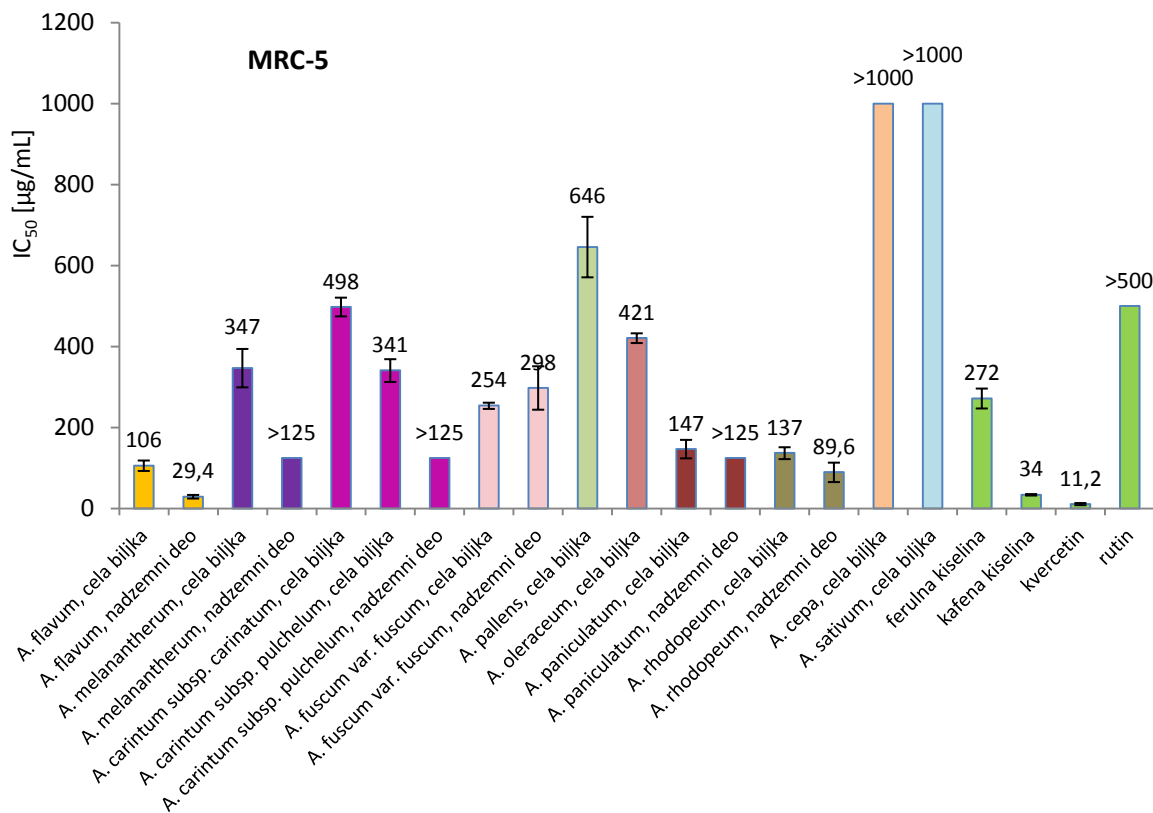
Tabela 4.18. IC_{50} vrednosti ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ekstrakata, standardnih jedinjenja i lekova i ne-tumor/tumor (NT/T) odnos nakon 2 h delovanja na ćelije humanih ćelijskih linija

	IC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^a				NT/T ^b		
	HeLa	MCF7	HT-29	MRC-5	HeLa	MCF7	HT-29
Ekstrakt							
FB	92,6±23,5	104±9,53	88,8±15,1	106±12,9	1,14	1,02	1,19
FB herba	42,3±10,4	25,4±4,59	130±3,62	29,4±4,46	0,70	1,16	0,23
MP	271±19,1	231±27,3	440±60,2	347±47,4	1,28	1,50	0,79
MP herba	>125	66,4±4,01	>500	>125	/	>1,88	/
CC	404±27,4	371±19,3	530±41,5	498±23,1	1,23	1,34	0,94
CP	278±33,2	255±31,9	250±10,4	341±28,1	1,23	1,34	1,36
CP herba	>125	>125	>500	>125	/	/	/
FF	285±31,5	261±14,9	537±49,2	254±7,7	0,89	0,97	0,47
FF herba	252±5,08	236±21,4	745±76,6	298±53,6	1,18	1,26	0,40
PL	526±33,3	537±33,7	884±25,3	646±74,7	1,23	1,20	0,73
OK	473±36,9	378±28,6	633±41,5	421±12,0	0,89	1,11	0,67
PT	178±23,3	135±25,6	96,7±13,4	147±22,8	0,83	1,09	1,52
PT herba	>125	>125	>500	>125	/	/	/
RH	69,3±1,52	67,8±1,52	106±12,6	137±14,6	1,98	2,02	1,29
RH herba	>125	90,7±21,7	>250	89,6±24,0	<1	0,99	<1
AC	699±46,8	>1000	>1000	>1000	>1	/	/
AS	>1000	>1000	>1000	>1000	/	/	/
Standard							
Ferulna kiselina	117±14,6	233±38,9	>500	272±24,6	2,32	1,17	<1
Kafena kiselina ^c	19,7±4,93	75,0±10,4	275±7,9	34,2±1,77	1,73	0,46	0,12
Kvercetin	11,2±1,21	12,1±0,43	43,0±6,74	11,2±2,62	1,00	0,93	0,26
Kemferol ^c	2,84±0,62	11,1±2,96	14,1±3,15	3,20±0,11	1,12	0,29	0,23
Rutin	>500	>500	>500	>500	/	/	/
Lek							
Doxorubicin®	0,34	0,41	1,05	0,22	0,65	0,54	0,21
Gemcitabine®	0,39	0,47	7,80	0,10	0,26	0,21	0,01

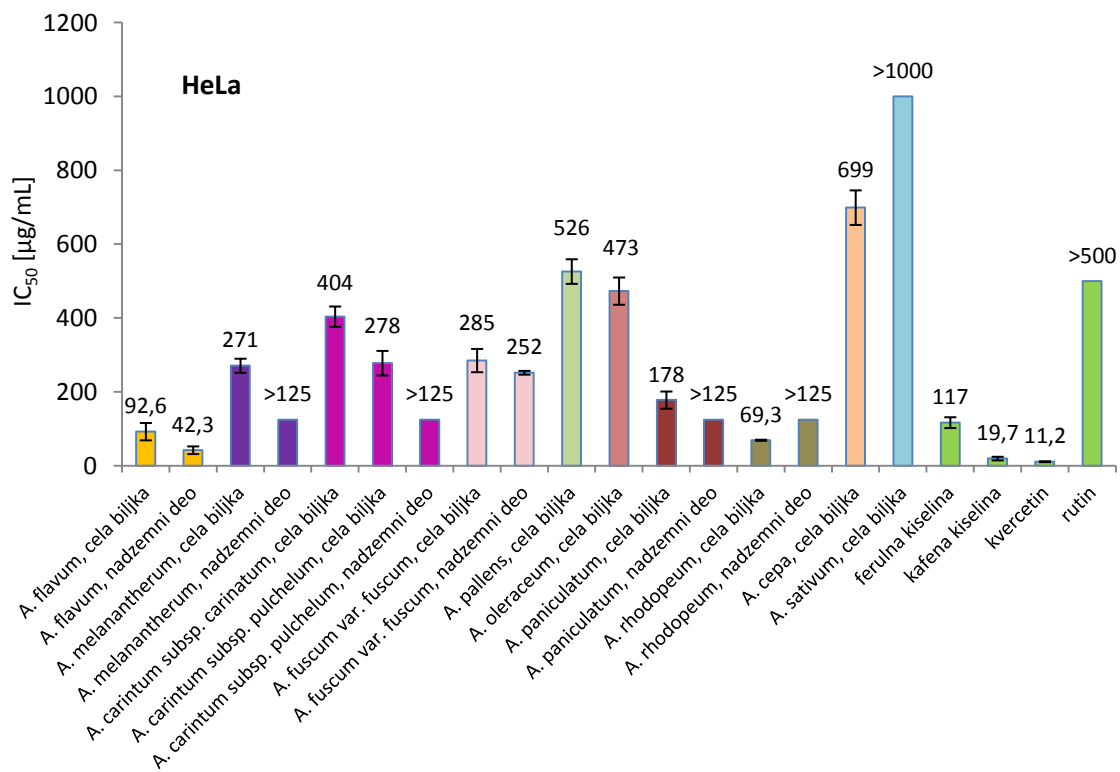
^a IC_{50} vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SD za osam ponavljanja; ^b Vrednosti iznad 1 odgovaraju većoj inhibitory aktivnosti ekstrakta na rast ćelija tumora u odnosu na zdrave ćelije; ^c rezultati preuzeti iz Simin i drugi, 2013; / – NT/T nije bilo moguće izračunati jer nije dostignuta IC_{50} vrednost ni na jednoj ćelijskoj liniji; FB – *A. flavum* subsp. *flavum*, MP – *A. melanatherum*, CC – *A. carinatum* subsp. *carinatum*, RH – *A. rhodopeum*, CP – *A. carinatum* subsp. *pulchelum*, PT – *A. paniculatum*, FF – *A. fuscum* subsp. *fuscum*, PL – *A. pallens*, OK – *A. oleraceum*, AC – *A. cepa*, i AS – *A. sativum*

Iz prikazanih rezultata vidi se da je većina ispitivanih ekstrakata ispoljila antiproliferativnu aktivnost, ali je stepen aktivnosti zavisio od vrste ćelijske linije i koncentracije ekstrakta. Iz dijagrama na *Slikama 4.32-4.35* uočava se da su HT-29 ćelije bile najrezistentnije na delovanje kako ekstrakata tako i standarda, dok su ostale ćelijske linije bile znatno osetljivije. Najizraženiji inhibitory efekat na rast tumorskih ćelija pokazao je ekstrakt nadzemnih delova vrste *A. flavum*, dostižući najniže IC_{50} vrednosti za ćelije adenokarcinoma dojke ($25,4 \mu\text{g mL}^{-1}$) i ćelije karcinoma grlića materice ($42,3 \mu\text{g mL}^{-1}$), dok je prema ćelijama adenokarcinoma debelog creva pokazao umerenu aktivnost ($IC_{50}=130 \mu\text{g mL}^{-1}$) (*Tabela 4.18*). Međutim, ovaj ekstrakt nije pokazao selektivno delovanje na tumorske ćelije, već je jednako inhibirao i rast zdravih fetalnih fibroplasta

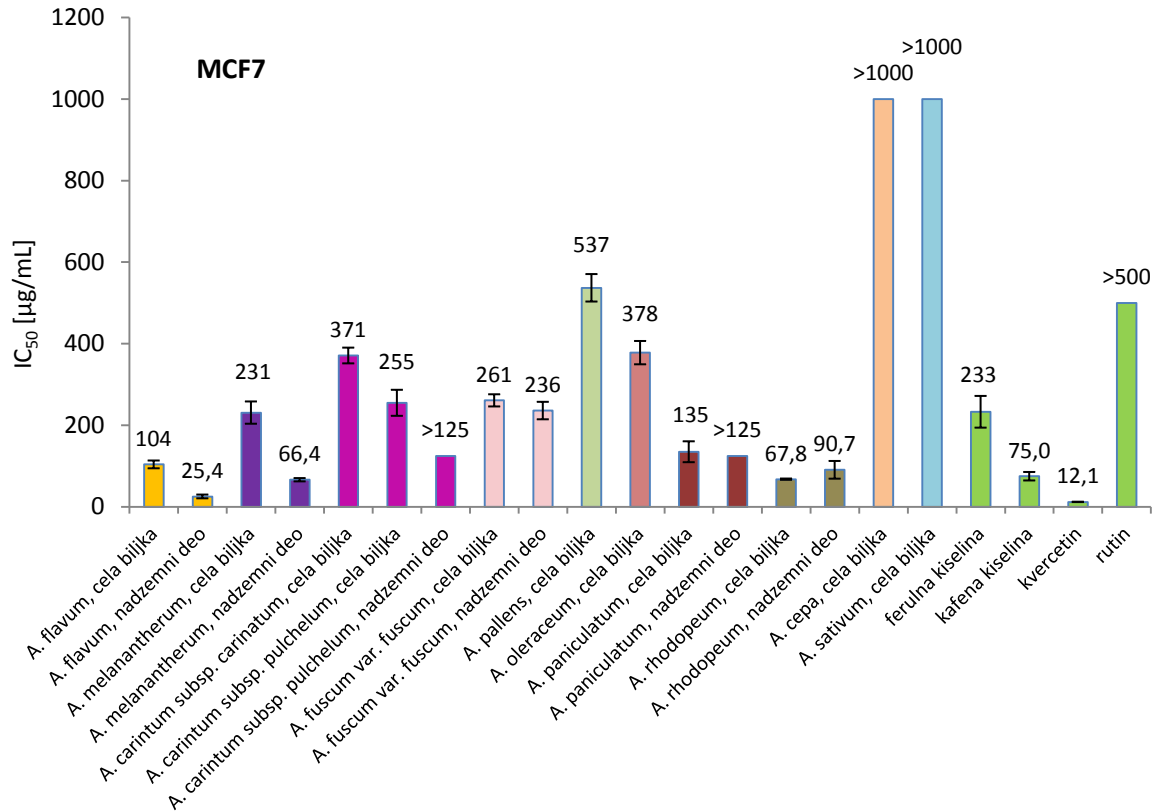
($IC_{50}=29,4 \mu\text{g mL}^{-1}$), što smanjuje mogućnost njegove primene u antitumorskoj terapiji. Genotoksični efekat ovog ekstrakta, koji je dokazan u prethodnom eksperimentu, jedan je od mehanizama njegovog antiproliferativnog delovanja.



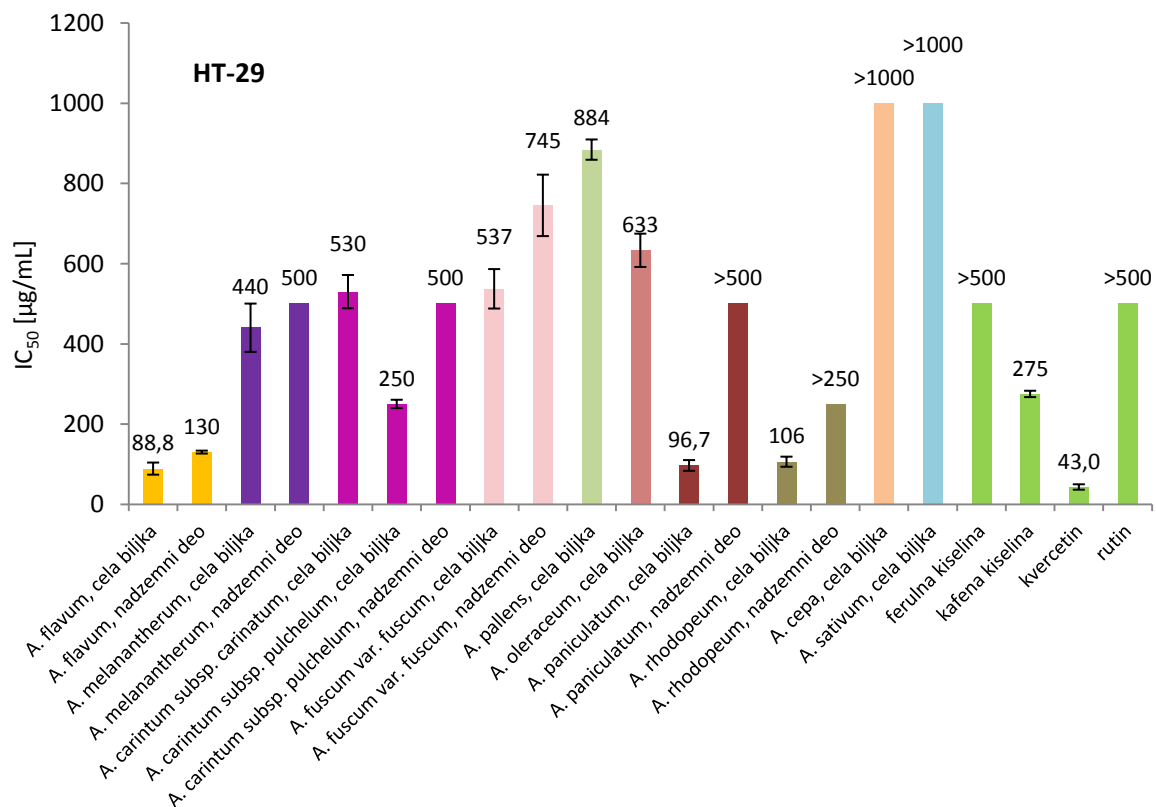
Slika 4.32 Uporedni prikaz uticaja metanolnih ekstrakata vrsta roda *Allium* na rast fetalnih fibroblasta pluća (MRC-5)



Slika 4.33. Uporedni prikaz uticaja metanolnih ekstrakata vrsta roda *Allium* na rast ćelija epitelnog karcinoma cerviksa (HeLa)



Slika 4.34. Uporedni prikaz uticaja metanolnih ekstrakata vrsta roda *Allium* na rast ćelija epitelnog adenokarcinoma dojke (MCF7)



Slika 4.35. Uporedni prikaz uticaja metanolnih ekstrakata vrsta roda *Allium* na rast ćelija adenokarcinoma debelog creva (HT-29)

Ekstrakt cele biljke vrste *A. flavum* inhibirao je rast MCF7, HeLa i MRC-5 ćelija nešto slabije od ekstrakta nadzemnih delova, dok je prema HT-29 ćelijama ispoljio jači efekat od ovog ekstrakta ($IC_{50}=88,8 \mu\text{g mL}^{-1}$, NT/T = 1,19). Takođe, slično se ponašao i ekstrakt cele biljke vrste *A. paniculatum*, koji je najjače delovao na HT-29 ćelije ($IC_{50}=96,7 \mu\text{g mL}^{-1}$, NT/T = 1,52), dok je kod ostalih ćelijskih linija dostigao 50% inhibicije rasta pri nešto višim koncentracijama (IC_{50} u opsegu $135\text{--}178 \mu\text{g mL}^{-1}$). Ekstrakt nadzemnih delova *A. paniculatum* pokazao je slabiju aktivnost od ekstrakta cele biljke, što ukazuje da se jedinjenja odgovorna za aktivnost kod ove vrste nalaze u lukovici. Ekstrakti vrste *A. rhodopeum* pokazali su takođe izuzetan potencijal inhibicije rasta tumorskih ćelija, naročito ekstrakt cele biljke, koji je ispoljio duplo jaču antiproliferativnu aktivnost prema ćelijama adenokarcinoma dojke ($IC_{50}=67,8 \mu\text{g mL}^{-1}$, NT/T=2,02) i ćelije karcinoma grlića materice ($IC_{50}=69,3 \mu\text{g mL}^{-1}$, NT/T=1,98) nego prema ćelijama izvedenim iz zdravog tkiva ($IC_{50}=137 \mu\text{g mL}^{-1}$), dok je na HT-29 ćelije nešto slabije delovao ($IC_{50}=106 \mu\text{g mL}^{-1}$, NT/T=1,29). Visoka antiproliferativna aktivnost na ćelije adenokarcinoma dojke zabeležena je još i u slučaju ekstrakta nadzemnih delova *A. melanatherum* ($IC_{50}=66,4 \mu\text{g mL}^{-1}$, NT/T >1,88), pri čemu su IC_{50} vrednosti ovog ekstrakta za ostale ispitivane ćelijske linije bile $>125 \mu\text{g mL}^{-1}$. Povoljni netumor/tumor koeficijenti za RH (vrednosti u rasponu od 2,0 do 1,3 za sve ispitivane tumorske ćelijske linije), MPH (1,88 za ćelije adenokarcinoma dojke), PT (1,52 za ćelije raka debelog creva) i FB ekstrakt (1,14 za ćelije raka grlića materice i 1,19 za ćelije adenokarcinoma debelog creva) idu u prilog njihovoj potencijalnoj primeni u antitumorskoj terapiji.

Ekstrakti vrsta *A. carinatum*, *A. fuscum*, *A. pallens* i *A. oleraceum* pokazali su slabu antiproliferativnu aktivnost (IC_{50} vrednosti u opsegu $250\text{--}880 \mu\text{g mL}^{-1}$), dok ekstrakti vrsta *A. cepa* i *A. sativum* u ispitivanom opsegu koncentracija ($62,5\text{--}1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) nisu delovali na rast ćelija, izuzev slabog inhibitornog efekta ekstrakta vrste *A. cepa* na rast HeLa ćelija ($IC_{50}=699 \mu\text{g mL}^{-1}$). Ovo je u saglasnosti sa ranije objavljenim rezultatima Votto-a i sar. (2010), prema kojima je ekstrakt crnog luka značajno inhibirao rast ćelija eritroleukemije tek u koncentracijama višim od 4 mg mL^{-1} . Rezultati dobijeni za ekstrakt *A. sativum* potvrđuje da su za antitumorsko delovanje belog luka, koje je dokazano u ranijim istraživanjima (Ip i drugi, 1996; Milner, 2001; Boivin i drugi, 2009) isključivo odgovorna nepolarna i isparljiva jedinjenja (prvenstveno sumporna), koja nisu prisutna u 70% MeOH ekstraktima ispitivanim u ovom radu.

Ispitivani komercijalni lekovi Doxorubicin® i Gemcitabine®, koji se koriste u hemoterapiji različitih vrsta kancera, pokazali su oko 100 puta jače antiproliferativno delovanje od najaktivnijih ekstrakata, sa IC_{50} vrednostima ispod $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, ali su NT/T vrednosti bile daleko ispod 1 (0,1–0,65), što znači da su mnogo jače inhibirali rast zdravih nego tumorskih ćelija. Iz ovoga proizilazi da je pronalaženje novih selektivnih inhibitora rasta tumorskih ćelija od izuzetnog značaja.

Od ispitivanih standarda fenolnih jedinjenja najjaču antiproliferativnu aktivnost prema sve četiri ćelijske linije ispoljili su kemferol, kvercetin i kafena kiselina (IC_{50} vrednosti u rasponu od $2,84$ do $75 \mu\text{g mL}^{-1}$, sa izuzetkom slabe aktivnosti kafene kiseline prema HT-29 ćelijama – $IC_{50}=274 \mu\text{g mL}^{-1}$), ukazujući na to da je prisustvo ovih jedinjenja u ekstraktima delimično odgovorno za njihovu citotoksičnu aktivnost. Ferulna kiselina umereno je inhibirala rast MCF7, HeLa i MRC-5 ćelija (IC_{50} vrednosti u opsegu $117\text{--}272 \mu\text{g mL}^{-1}$), dok na rast HT-29 ćelija nije delovala ($IC_{50}>500 \mu\text{g mL}^{-1}$). Rutin nije pokazao antiproliferativni efekat ni prema jednoj ispitivanoj ćelijskoj liniji čak ni u koncentraciji od $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, što ukazuje na to da ogromna količina rutina prisutna u ekstraktima vrsta *A. melanatherum*, *A. flavum*, *A. paniculatum* i *A. fuscum* ne doprinosi njihovoj citotoksičnoj aktivnosti. Velika razlika u aktivnosti flavonoidnog aglikona kvercetina i njegovog glikozida rutina ukazuje na važnu ulogu slobodne hidroksilne grupe na C-3 atomu kvercetina u antiproliferativnoj aktivnosti.

S obzirom da je u prethodnim eksperimentima utvrđeno da ekstrakti *A. flavum*, *A. rhodopeum* i *A. paniculatum* pokazuju jako inhibitorno delovanje na 12-(S)-lipoksigenazu, za koju je dokazano da je prekomerno ekspresovana u tkivima mnogih tumora (prostate, pankreasa, dojki, debelog creva i pluća) i ima ulogu u proliferaciji, adheziji i motilitetu tumorskih ćelija (Nie i Honn, 2002; Wong i drugi, 2001), može se zaključiti da je inhibicija 12-(S)-LOX jedan od mehanizama citotoksičnog delovanja ovih ekstrakata na tumorske ćelije.

Sposobnost indukcije apoptoze

Kod tumorskih ćelija proliferacija je prekomerna a apoptoza je inhibirana različitim mehanizmima. Zbog toga se uspešnim antitumorskim lekom smatra supstanca koja ima izraženu sposobnost inhibicije proliferacije i/ili sposobnost indukcije apoptoze. Pored toga važno je da ova supstanca ne dovodi do nekroze tumorskih ćelija, jer nekrotične ćelije ne šalju imunom sistemu odgovarajuće hemijske signale koji bi pokrenuli fagocitozu mrtvih ćelija, već dolazi do autolize ćelije, koja je praćena inflamacijom i oštećenjem okolnog tkiva (Kroemer i drugi, 2005). Većina lekova koji se danas koriste u terapiji kancera deluje tako što na različite načine indukuje apoptozu (Taraphdar i drugi, 2001). Brojna istraživanja pokazuju da mnogi prirodni proizvodi, u koje spadaju i fenolne kiseline, flavonoidi i sumporna jedinjenja, pokreću apoptozu u neoplastičnim ćelijama i to tako što ili stimulišu indukcione faktore apoptoze ili sprečavaju delovanje njenih inhibitora, pri čemu su ovi efekti na zdrave ćelije mnogo manje izraženi (Chiao i drugi, 1995; Rao i drugi, 1995; Samaha i drugi 1997; Anantharaman i drugi, 2014).

U ovom radu ispitana je sposobnost ekstrakata da indukuju smrt tumorskih ćelija, pri čemu je detektovan i tip ćelijske smrti. Za ispitivanje su odabrani ekstrakti koji su u prethodnom eksperimentu pokazali značajnu sposobnost inhibicije rasta tumorskih ćelija ($IC_{50} < 100 \mu g mL^{-1}$), a tu spadaju ekstrakti vrsta *A. flavum* i *A. rhodopeum*, zatim ekstrakt cele biljke *A. paniculatum* i ekstrakt nadzemnih delova vrste *A. melanantherum*. Za detekciju i kvantifikaciju tipa ćelijske smrti korišćena je enzimaska sendvič-immunoabsorbciona metoda (Cell Death Detection ELISA^{PLUS} kit), koja se zasniva na kvantifikaciji mono- i oligonukleozoma u citoplazmatskoj frakciji pre i posle liziranja ćelija. Količina mono- i oligonukleozoma proporcionalna je intenzitetu boje koja nastaje u reakciji sa ABTS radikalom, pri čemu količina nukleozoma u supernatantu pre liziranja ćelija odgovara količini nekrotičnih ćelija, dok je količina nukleozoma posle lize proporcionalna količini apoptotičnih ćelija. Dobijeni rezultati prikazani su u *Prilogu 8.11 (Tabela 8.78.)* i *Tabelama 4.19. i 4.20.*

Tabela 4.19. Faktori povećanja apoptoze (EFA) i nekroze (EFN), odnos apoptoza/nekroza (A/N) i porast apoptoze u odnosu na porast nekroze (AI) u Hela i MCF7, HT-29 i MRC-5 ćelijskim linijama

Ekstrakt	HeLa				MCF7			
	EFA	EFN	A/N ^a	AI	EFA	EFN	A/N ^a	AI
<i>A. flavum</i> , cela biljka	2,52	1,12	0,6	2,2	0,99	0,51	5,13	1,93
<i>A. flavum</i> , nadzemni delovi	2,41	1,06	0,6	2,2	0,97	1,23	0,30	0,79
<i>A. rhodopeum</i> , nadzemni delovi	/	/	/	/	0,87	0,61	3,83	1,44
<i>A. rhodopeum</i> , cela biljka	1,43	1,04	0,4	1,4	0,97	1,14	0,32	0,84
<i>A. melanantherum</i> , nadzemni delovi	/	/	/	/	2,46	0,58	11,32	4,26
<i>A. paniculatum</i> , cela biljka	/	/	/	/	/	/	/	/

^a Vrednosti iznad 1 označavaju favorizaciju apoptoze u odnosu na nekrozu; / – Kriterijum $IC_{50} < 100 \mu g mL^{-1}$ nije dostignut

Tabela 4.20. Faktori povećanja apoptoze (EFA) i nekroze (EFN), odnos apoptoza/nekroza (A/N) i porast apoptoze u odnosu na porast nekroze (AI) u HeLa i MCF7, HT-29 i MRC-5 ćelijskim linijama

Ekstrakt	HT-29				MRC-5			
	EFA	EFN	A/N ^a	AI	EFA	EFN	A/N ^a	AI
<i>A. flavum</i> , cela biljka	/	/	/	/	14,4	1,35	1,52	10,9
<i>A. flavum</i> , nadzemni delovi	14,1	8,33	0,87	1,71	23,3	1,83	1,80	12,9
<i>A. rhodopeum</i> , nadzemni delovi	/	/	/	/	3,70	0,77	6,93	49,5
<i>A. rhodopeum</i> , cela biljka	12,2	3,9	3,22	3,13	/	/	/	/
<i>A. melanantherum</i> , nadzemni delovi	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>A. paniculatum</i> , cela biljka	21,7	9,92	1,12	2,20	/	/	/	/

^a Vrednosti iznad 1 označavaju favorizaciju apoptoze u odnosu na nekrozu; / – Kriterijum IC₅₀ <100 µg mL⁻¹ nije dostignut

Iz dobijenih rezultata vidi se da je u većini slučajeva zabeležen porast apoptoze i nekroze u odnosu na negativnu kontrolu (faktori povećanja apoptoze (EFA) i nekroze (EFN) veći od 1), što znači da su ekstrakti indukovali ćelijsku smrt u ispitivanim ćelijskim linijama. Od svih ispitivanih ekstrakata samo su ekstrakt nadzemnih delova vrste *A. flavum* i ekstrakt cele biljke *A. rhodopeum* izazvali blag porast nekroze na MCF7 ćelijskoj liniji i nisu uticali na stepen apoptoze (sa vrednostima AI od 0,79 i 0,84, respektivno), što ukazuje na to da indukcija ćelijske smrti nije jedan od mehanizama citotoksičnog delovanja ovih ekstrakata na MCF7 ćelije. Oba ekstrakta vrste *A. flavum* i ekstrakt nadzemnih delova vrste *A. rhodopeum*, značajno su indukovali apoptozu u HeLa i/ili HT-29 ćelijama (porast apoptoze u odnosu na porast nekroze u opsegu 2,25-1,44), ali je indukcija ćelijske smrti u ćelijama izvedenim iz zdravog tkiva bila je još veća (porast apoptoze u odnosu na porast nekroze u opsegu ekstremno visokih vrednosti od 49,5-10,9), što značajno smanjuje njihov potencijal u antitumorskoj terapiji. S druge strane, ekstrakt nadzemnih delova *A. melanantherum* indukovao je apoptozu i smanjio nekrozu u MCF7 ćelijama (EFA=2,46 i EFN=0,58), pri čemu nije delovao na MRC-5 ćelije. Takođe, ekstrakt cele biljke *A. paniculatum* snažno je inicirao ćelijsku smrt u HT-29 ćelijama, pri čemu je porast apoptoze bio duplo veći od porasta nekroze (EFA=21,7 i EFN=9,92), dok na zdrave ćelije nije delovao. Ovo ukazuje da je dominantan mehanizam citotoksičnog delovanja ekstrakta vrste *A. paniculatum* na HT-29 ćelije indukcija ćelijske smrti. Ekstrakt cele biljke *A. rhodopeum* indukovao je apoptozu u HT-29 i HeLa ćelijama, dok na ćelije zdravog tkiva nije delovao. Sumiranjem dobijenih rezultata može se zaključiti da ekstrakti celih biljaka *A. paniculatum* i *A. rhodopeum*, kao i ekstrakt nadzemnih delova *A. melanantherum* imaju visok potencijal za primenu u antitumorskoj terapiji.

5. Zaključak

Ova doktorska disertacija predstavlja doprinos ukupnim saznanjima o fitohemijskom sastavu i biološkom potencijalu vrsta roda *Allium*, od kojih je većina zbog svoje arome i hranjive vrednosti našla primenu u ljudskoj ishrani, dok se mnoge koriste i kao lekovite biljke. Ovaj rad pruža nove informacije o hemijskom profilu, antioksidantnom, antiinflamatornom, antimikrobnom i antimutagenom potencijalu, kao i genotoksičnom i citotoksičnom efektu ekstrakata 10 samoniklih taksona roda *Allium* sect. *Codonoprasum* (*A. carinatum* subsp. *pulchellum*, *A. carinatum* subsp. *carinatum*, *A. fuscum* var. *gracile*, *A. fuscum* var. *fuscum*, *A. flavum* subsp. *flavum*, *A. melanantherum*, *A. oleraceum*, *A. paniculatum* subsp. *marginatum*, *A. pallens* subsp. *tenuiflorum* i *A. rhodopeum*), sakupljenih na lokalitetima u Srbiji. Većina ovih biljaka je prvi put ispitivana u ovom radu.

➤ *Headspace* GC-MS analizom volatilnih komponenti, nastalih delovanjem aliinaze nakon dezintegracije svežih lukovica, utvrđeno je da je dimetil-disulfid najdominantnija isparljiva komponenta, iz čega proizilazi da je metiin dominantan ACSO u vrstama sect. *Codonoprasum*. Karakterističan izgled GC-MS hromatograma vrsta iz ove sekcije može poslužiti za njihovo razlikovanje od vrsta ostalih sekcija roda *Allium* prilikom hemotaksonomske determinacije.

➤ Kvalitativnom analizom metanolnih ekstrakata vrsta roda *Allium* primenom tečnehromatografskih metoda (LC-DAD-MS i LC-MS-MS) detektovana su 44 jedinjenja, od kojih je 29 preliminarno identifikovano. 25 identifikovanih jedinjenja su iz klase flavonoida, gde su daleko najdominantniji derivati kvercetina (12 glikozida kvercetina i 9 glikozida metil-kvercetina (ramnetina ili izoramnetina)). Preostala četiri detektovana flavonoida su glikozidi kemferola ili luteolina. Utvrđeno je da nema značajne razlike u kvalitativnom sastavu između uzoraka iste vrste sa različitih lokaliteta, već samo malih razlika u sadržaju pojedinih jedinjenja, što fenolna jedinjenja čini pouzdanim i stabilnih hemotaksonomskim markerima. Rutin je u izrazito visokoj koncentraciji zastupljen u vrsti *A. melanantherum*, u nešto manjoj u vrstama *A. fuscum*, *A. flavum*, *A. paniculatum* i *A. carinatum* subsp. *pulchellum*, zatim u maloj koncentraciji u vrstama *A. rhodopeum* i *A. carinatum* subsp. *carinatum*, dok u vrsti *A. pallens* nije uopšte prisutan. Vrsta *A. pallens* se i po sastavu ostalih flavonoida najviše izdvaja od ostalih vrsta. U ekstraktu vrste *A. oleraceum* nisu detektovani flavonoidi, pa se pretpostavlja da je koncentracija ovih jedinjenja, ako su prisutna, suviše mala da bi bila detektovana ovom metodom.

➤ Primenom LC-MS/MS tehnike određen je sadržaj 44 fenolna jedinjenja i hinske kiseline u ekstraktima nadzemnih delova i ekstraktima lukovica svih 10 taksona (pri čemu su za većinu taksona analizirani uzorci sa više lokaliteta). Ukupan sadržaj kvantifikovanih jedinjenja bio je znatno veći u nadzemnim delovima biljaka nego u lukovicama (6,09–271 mg g⁻¹ s.e. i 0,76–2,85 mg g⁻¹ s. e., respektivno). U kvalitativnom sastavu uzoraka istog taksona sa različitih lokaliteta nije bilo veće razlike, ali je varijabilnost u kvantitativnom sastavu bila veoma izražena. Najdominantnija flavonoidna jedinjenja u ispitivanim vrstama sect. *Codonoprasum* su glikozidi kvercetina (rutin, hiperozid, izokvercitrin, izoramnetin), kao i kemferol-3-*O*-glukozid (astragalín). Rezultati PCA analize pokazuju da se vrsta *A. melanantherum* od ostalih izdvaja prvenstveno na osnovu visokog sadržaja rutina i niskog sadržaja kvercetin-3-*O*-glukozida, dok vrstu *A. flavum* od ostalih odvajaju visoki sadržaji rutina i kvercetin-3-*O*-glukozida. Vrste *A. pallens* i *A. oleraceum* za razliku od ostalih vrsta ne sadrže rutin, a sadrže znatnu količinu hiperozida, što bi moglo biti značajno sa hemotaksonomskog aspekta. Vrstu *A. rhodopeum* karakteriše izuzetno mali sadržaj svih ispitivanih fenolnih jedinjenja (ukupan sadržaj u ekstraktu nadzemnih delova je 6 mg g⁻¹ s. e.). Izokvercitrin i astragalín prisutni su u značajnoj količini u ekstraktima nadzemnih delova biljaka svih ispitivanih taksona (0,89–57,2 mg g⁻¹ i 0,16–5,81 mg g⁻¹, respektivno). Aglikoni kvercetin, kemferol i izoramnetin prisutni su u većini ispitivanih vrsta, ali u vrlo maloj količini.

➤ Sadržaj ukupnih monomernih antocijana u ekstraktima cvasti vrsta sect. *Codonoprasum* kretao se od 10,7 do 969 µg ekvivalenata cijanidin-3-glukoziada g⁻¹ s. e. Najviši sadržaj antocijana nađen je u ekstraktima podvrsta *A. carinatum* subsp. *carinatum* i *A. carinatum* subsp. *pulchellum*. Vrste *A. rhodopeum*, *A. paniculatum* i *A. melanantherum* sadržale su takođe znatnu količinu antocijana (91,3–294 µg ekv. cijanidin-3-glukoziada g⁻¹ s. e.), dok je sadržaj ovih jedinjenja u ekstraktima ostalih vrsta bio veoma nizak (10,7–111 µg ekv. cijanidin-3-glukoziada g⁻¹ s. e.).

➤ Aktivnost enzima aliinaze, koji katalizuje transformaciju *S*-alk(en)il-L-cistein-sulfoksida u tiosulfinate (jedinjenja odgovornih za miris i ukus lukova), bila je veoma visoka u svim ispitivanim vrstama (najviša u vrsti *A. flavum* (28,0–46,9 µmol piruvata g⁻¹ sveže lukovice), a najniža u dvema podvrstama vrste *A. carinatum* (3,65 µmol piruvata g⁻¹ fw u podvrsti *pulchellum* i 7,20 µmol piruvata g⁻¹ sveže lukovice u podvrsti *carinatum*)).

➤ U cilju procene antioksidantnog potencijala vrsta roda *Allium* sect. *Codonoprasum* određen je ukupni redukcionni potencijal, sposobnost neutralizacije stabilnih DPPH• i ABTS^{•+} radikala, sposobnost hvatanja OH• i NO radikala, kao i sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije metanolnih ekstrakata celih biljaka. Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da su u ekstraktima *A. flavum*, *A. fuscum* var. *fuscum*, *A. oleraceum* i *A. paniculatum*, koji su ispoljili snažnu antioksidantnu aktivnost u testovima za određivanje sposobnosti hvatanja DPPH•, ABTS^{•+} i NO radikala i sposobnosti inhibicije LP, prisutna jedinjenja sa visokom redukcionom sposobnošću, odnosno sposobnošću doniranja elektrona ili H atoma. Ekstrakt nadzemnih delova vrste *A. flavum* ispoljio je primetno jaču aktivnost u pomenutim testovima od ekstrakata celih biljaka ove vrste, iz čega sledi da su fenolna jedinjenja, čija je koncentracija znatno viša u ekstraktu herbe nego u ekstraktu lukovice, odgovorna za izrazite redukcionne osobine ovog ekstrakta. Najveću sposobnost hvatanja OH radikala ispoljili su ekstrakti vrsta *A. pallens*, *A. fuscum* i *A. rhodopeum*, što ukazuje na to da su u ovim ekstraktima prisutna jedinjenja sa izraženim helirajućim svojstvima. Ekstrakt crnog luka je u poređenju sa ekstraktima celih biljaka vrsta sect. *Codonoprasum* u većini testova ispoljio jaču aktivnost, dok je aktivnost ispitivanih ekstrakata bila znatno manja u poređenju sa sintetskim antioksidansom BHA.

➤ Antiinflamatorna aktivnost ispitivana je praćenjem uticaja ekstrakata na produkciju metabolita arahidonske kiseline u COX-1 i 12-LOX putu u trombocitima, pomoću LC-MS/MS tehnike. Ekstrakti celih biljaka vrsta sect. *Codonoprasum* pokazali su dozno-zavisnu inhibitornu aktivnost na produkciju 12-HHT, TXB₂, PGE₂ i 12-HETE. IC₅₀ vrednosti za inhibiciju produkcije 12-HHT kretale su se u opsegu od 0,70 mg mL⁻¹ do 4,68 mg mL⁻¹, za TXB₂ od 0,63 mg mL⁻¹ do 5,35 mg mL⁻¹, za PGE₂ od 0,57 mg mL⁻¹ do 7,99 mg mL⁻¹, a za 12-HETE od 0,08 mg mL⁻¹ do 11,99 mg mL⁻¹. Snažnu antiinflamatornu aktivnost ispoljili su ekstrakt nadzemnih delova vrste *A. flavum* i ekstrakti celih biljaka vrsta *A. rhodopeum*, *A. oleraceum*, *A. paniculatum* i *A. cepa*. U poređenju sa poznatim COX-1 inhibitorom aspirinom i 12-LOX inhibitorom kvercetinom, ekstrakti ispitivanih vrsta roda *Allium* pokazali su slabiju sposobnost inhibicije ovih enzima, ali je aktivnost ekstrakata bila uporediva sa aktivnošću dobro poznate antiinflamatorne droge *Plantago major* L. Utvrđeno je da se ekstrakt nadzemnih *A. flavum* u koncentracijama ispod 0,25 mg mL⁻¹ ponaša kao selektivni 12-LOX inhibitor. Inhibitorno delovanje ispitivanih ekstrakata na enzime ciklooksigenaznog puta moglo bi biti od značaja u sprečavanju i lečenju bolesti koje nastaju kao posledica hronične inflamacije, dok bi inhibitorno delovanje na trombocitnu 12-(*S*)-lipoksigenazu moglo naći primenu u prevenciji i lečenju kancerogenih obolenja, psorijaze, ateroskleroze i reumatoidnog artritisa.

➤ U okviru mikrobioloških testova, ispitana je antibakterijska aktivnost ekstrakata na četiri G⁺ i četiri G⁻ bakterije disk-difuzionom metodom i antiviralni efekat na bakteriofag δ iz familije *Podoviridae* i fag σ-1 iz familije *Siphoviridae*. Od svih ispitivanih ekstrakata, jedino je

ekstrakt vrste *A. melanantherum* pokazao slabu antibakterijsku aktivnost u disk-difuzionom testu i to samo prema soju *Staphylococcus aureus*, što se može objasniti izuzetno visokim sadržajem rutina u ovom ekstraktu. Minimalna baktericidna koncentracija (MBC) određena dilucionom metodom za ovaj ekstrakt iznosila je $15,4 \text{ mg mL}^{-1}$. Ispitivani ekstrakti (*A. fuscum* subsp. *fuscum*, *A. paniculatum*, *A. rhodopeum*, *A. melantherum*, *A. cepa* i *A. sativum*) nisu ispoljili antiviralnu aktivnost ni prema jednom bakteriofagu u koncentracijama do 40 mg mL^{-1} , dok je standard kvercetin pokazao slabu antiviralnu aktivnost ($\text{PhI}_{50}=108 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$).

➤ U ovom radu antimutagena aktivnost ekstrakata vrsta roda *Allium* ispitivana je merenjem njihovog protektivnog delovanja na spontanu i indukovanu oksidativnu mutagenezu u bakteriji *Esherichia coli* WP2. Ekstrakt nadzemnih delova vrste *A. melanantherum* u ispitivanom opsegu koncentracija ($0,1 - 4 \text{ mg}$ po petri šolji) nije ispoljio antimutageni efekat ni na spontanu ni na indukovanu mutagenezu. Ekstrakt vrste *A. flavum* je pri nižim koncentracijama ($0,1$ i $0,5 \text{ mg/pš}$) pokazao slab antimutageni efekat na indukovanu mutagenezu (inhibicija mutageneze 18% i 33% , respektivno) i na taj način inhibirao delovanje *t*-BOOH. Međutim, pri višim koncentracijama ekstrakta ovaj efekat nije zabeležen. Ovakav rezultat ukazuje da veće koncentracije ekstrakta u prisustvu *t*-BOOH mogu čak delovati prooksidantno, zbog čega bi eventualna primena ekstrakta nadzemnih delova vrste *A. flavum* morala biti ograničena na niže koncentracije. Ekstrakt vrste *A. carinatum* subsp. *carinatum*, takođe nije pokazao antimutageni efekat, već je delovao slabo promutageno i na sponatnu i na indukovanu mutagenezu.

➤ Genotoksični efekat ekstrakata celih biljaka vrsta *A. flavum*, *A. melanantherum*, *A. rhodopeum*, *A. carinatum* subsp. *pulchelum*, *A. paniculatum* i ekstrakta nadzemnih delova vrste *A. flavum* ispitan je na zdravim humanim fibroplastima pluća (MRC-5) i ćelijama karcinoma debelog creva (HT-29). Za detekciju DNK oštećenja korišćena je elektroforeza pojedinačnih ćelija u agaroznom gelu ili alkalni komet test. Ekstrakt nadzemnih delova vrste *A. flavum* u koncentraciji od $15 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ pokazao je slab genotoksični efekat na zdrave fibroplaste pluća, dok u ćelijama adenokarcinoma debelog creva nije izazvao prekide DNK lanaca. Ovo ukazuje na oprez u slučaju eventualne primene ovog ekstrakta u medicinske svrhe i neophodnost strogog definisanja njegove maksimalne dozvoljene doze. Ostali ekstrakti nisu doveli do oštećenja DNK u ispitivanim ćelijskim linijama, što ukazuje da je njihova upotreba u koncentracijama nižim od ispitivanih bezbedna.

➤ U ovom radu ispitana je antiproliferativna aktivnost metanolnih ekstrakata celih biljaka i ekstrakata nadzemnih delova (herbi) vrsta *A. flavum* subsp. *flavum*, *A. melanantherum*, *A. carinatum* subsp. *carinatum*, *A. rhodopeum*, *A. carinatum* subsp. *pulchelum*, *A. paniculatum*, *A. fuscum* subsp. *fuscum*, *A. pallens*, *A. oleraceum*, *A. cepa* i *A. sativum* na jednoj zdravoj (fetalni fibroplasti pluća – MRC-5) i tri tumorske ćelijske linije (epitelni karcinom cerviksa – HeLa, adenokarcinom dojke – MCF7, adenokarcinom debelog creva – HT-29), pomoću sulforhodamin B (SRB) testa. Ispitana je i aktivnost standardnih jedinjenja – ferulne i kafene kiseline, kvercetina, kemferola i rutina. Većina ispitivanih ekstrakata ispoljila je antiproliferativnu aktivnost, ali je stepen aktivnosti zavisio od vrste ćelijske linije i koncentracije ekstrakta. HT-29 ćelije bile najrezistentnije na delovanje kako ekstrakata tako i standarda. U poređenju sa komercijalnim antitumorskim lekovima Doxorubicin®-om i Gemcitabine®-om, čiji nedostatak je što mnogo jače inhibiraju rast zdravih nego tumorskih ćelija, najaktivniji ekstrakti pokazali su oko 100 puta slabije antiproliferativno delovanje. Najizraženiji inhibitoryni efekat na rast tumorskih ćelija pokazao je ekstrakt nadzemnih delova vrste *A. flavum*, dostižući najniže IC_{50} vrednosti za ćelije adenokarcinoma dojke ($25,4 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) i ćelije karcinoma grlića materice ($42,3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), ali je jednako inhibirao i rast zdravih fetalnih fibroplasta. Povoljni ne-tumor/tumor koeficijenti (>1) zabeleženi su za ekstrakte celih biljaka *A. rhodopeum*, *A. paniculatum* i *A. flavum* i ekstrakt nadzemnih delova *A. melanantherum*, što ide u prilog njihovoj potencijalnoj primeni u

antitumorskoj terapiji. Ekstrakti vrsta *A. carinatum*, *A. fuscum*, *A. pallens* i *A. oleraceum* pokazali su slabu antiproliferativnu aktivnost (IC_{50} vrednosti u opsegu $250\text{--}880\ \mu\text{g mL}^{-1}$), dok ekstrakti vrsta *A. cepa* i *A. sativum* u ispitivanom opsegu koncentracija ($62,5\text{--}1000\ \mu\text{g mL}^{-1}$) nisu delovali na rast ćelija (izuzev slabog inhibitorynog efekta ekstrakta vrste *A. cepa* na rast HeLa ćelija ($IC_{50}=699\ \mu\text{g mL}^{-1}$)). Od ispitivanih standarda fenolnih jedinjenja najjaču antiproliferativnu aktivnost na sve četiri ćelijske linije ispoljili su kemferol, kvercetin i kafena kiselina, ukazujući na to da je prisustvo ovih jedinjenja u ekstraktima delimično odgovorno za njihovu citotoksičnu aktivnost. Rutin nije pokazao antiproliferativni efekat, iz čega sledi da ogromna količina rutina prisutna u pojedinim ekstraktima ne doprinosi njihovoj citotoksičnoj aktivnosti.

➤ Sposobnost ekstrakata da indukuju smrt tumorskih ćelija (MCF7, HeLa i HT-29) ispitana je pomoću enzimske sendvič-immunosorbcijske metode (Cell Death Detection ELISA^{PLUS} kita), pri čemu je određen i tip ćelijske smrti (apoptoza i nekroza). Ispitani su ekstrakti sa značajnom antiproliferativnom aktivnošću ($IC_{50}<100\ \mu\text{g mL}^{-1}$) – ekstrakti vrsta *A. flavum* i *A. rhodopeum*, ekstrakt cele biljke *A. paniculatum* i ekstrakt nadzemnih delova vrste *A. melanantherum*. Većina ispitivanih ekstrakata indukovala je smrt u tumorskim ćelijskim linijama. Ekstrakti vrste *A. flavum* i ekstrakt nadzemnih delova vrste *A. rhodopeum*, značajno su indukovali apoptozu u HeLa i/ili HT-29 ćelijama, ali je indukcija ćelijske smrti u ćelijama izvedenim iz zdravog tkiva bila je još veća, što značajno smanjuje njihov potencijal u antitumorskoj terapiji. S druge strane, ekstrakt nadzemnih delova *A. melanantherum* indukovao je apoptozu i smanjio nekrozu u MCF7 ćelijama (EFA=2,46 i EFN=0,58), pri čemu nije delovao na MRC-5 ćelije. Takođe, ekstrakt cele biljke *A. paniculatum* snažno je inicirao ćelijsku smrt u HT-29 ćelijama, pri čemu je porast apoptoze bio duplo veći od porasta nekroze (EFA=21,7 i EFN=9,92), dok na zdrave ćelije nije delovao. Ekstrakt cele biljke *A. rhodopeum* indukovao je apoptozu u HT-29 i HeLa ćelijama, dok na ćelije zdravog tkiva nije delovao. Is svega navedenog sledi da ekstrakti celih biljaka *A. paniculatum* i *A. rhodopeum*, kao i ekstrakt nadzemnih delova *A. melanantherum* imaju visok potencijal za primenu u antitumorskoj terapiji.

Sumiranjem dobijenih rezultata može se zaključiti da ispitivani predstavnici roda *Allium* sect. *Codonoprasum* predstavljaju bogate izvore biološki aktivnih jedinjenja sa širokim spektrom bioloških aktivnosti. Sa hemotaksonomskog aspekta značajno je da se dimetil-disulfid izdvaja kao najdominantnija i često jedina isparljiva komponenta, da ekstrakti većine vrsta sadrže veliku količinu flavonoida (prvenstveno derivata kvercetina), da se vrste *A. pallens* i *A. oleraceum* izdvajaju od ostalih po tome što ne sadrže rutin a sadrže hiperozid, da je vrsta *A. rhodopeum* siromašna fenolnim jedinjenjima i da su sve vrste, osim vrste *A. flavum*, bogate antocijanima. Aktivnost aliinaze je visoka u svim ispitivanim vrstama. Većina ispitivanih ekstrakata, izuzev ekstrakata vrsta *A. carinatum* i *A. melanantherum*, pokazala je izraženu antioksidantnu aktivnost, dok su ekstrakti vrsta *A. flavum*, *A. rhodopeum*, *A. oleraceum* i *A. paniculatum* snažni antiinflamatorni agensi. Ekstrakti ispitivanih predstavnika sect. *Codonoprasum* nisu pokazali antimikrobnu i antimutagenu aktivnost. Takođe, ovi ekstrakti nisu ispoljili genotoksični efekat na ćelije zdravog tkiva (izuzev slabog genotoksičnog efekta ekstrakta nadzemnih delova *A. flavum*), što ukazuje na bezbednost upotrebe vrsta sect. *Codonoprasum* kao hrane ili u obliku lekova. Ekstrakti celih biljaka *A. paniculatum* i *A. rhodopeum*, kao i ekstrakt nadzemnih delova *A. melanantherum* pokazali su snažnu antiproliferativnu aktivnost sa povoljnim ne-tumor/tumor koeficijentima i indukovali apoptozu u tumorskim ćelijama, iz čega se može zaključiti da imaju visok potencijal primene u antitumorskoj terapiji.

6. Summary

Genus *Allium* is by far the largest genus of Alliaceae family, comprising more than 750 species, which are distributed predominantly in southern Europe and western Asia. Members of genus *Allium* have been used for thousands of years for their medicinal properties and characteristic flavor. Although chemical composition and biological activities of two species of genus *Allium* – *A. sativum* and *A. cepa* are well researched, data on other species, including *Codonoprasum* section species, are still lacking. Therefore, the aim of the present doctoral thesis was to investigate the chemical composition and biological activities of 10 unexplored wild growing taxa from *Codonoprasum* section (*A. carinatum* subsp. *pulchellum*, *A. carinatum* subsp. *carinatum*, *A. fuscum* var. *gracile*, *A. fuscum* var. *fuscum*, *A. flavum* subsp. *flavum*, *A. melanantherum*, *A. oleraceum*, *A. paniculatum* subsp. *marginatum*, *A. pallens* subsp. *tenuiflorum* and *A. rhodopeum*), many of which are traditionally used as a food and spices. The samples were collected from 27 locations in Serbia.

Phytochemical characterisation included: *headspace* GC-MS analysis of fresh bulb volatiles, LC-DAD-MS and LC-MS-MS qualitative analysis of methanol extracts, LC-MS-MS quantitative analysis of 44 selected phenolic compounds in methanol extracts, determination of total monomeric anthocyanins content and alliinase activity. PCA analysis of the obtained data was used in order to define chemotaxonomic markers for investigated species.

In order to assess the biological potential of methanol extracts, the antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, antimutagenic, genotoxic and antiproliferative activities of the extracts were studied. Antioxidant potential was evaluated by several assays (total reducing capacity, DPPH[•], NO, ABTS^{•+} and OH[•] scavenging capacity and lipid peroxidation inhibition ability). Anti-inflammatory activity was observed by measuring the extracts ability to inhibit eicosanoids production in human platelets. Antimicrobial properties were examined by measuring antibacterial activity against eight bacterial strains by disk diffusion and MBC assays, and antiviral activity against two phages of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimutagenic potential against spontaneous and *t*-BOOH induced mutagenesis was investigated in *E. coli* IC202. Genotoxic effect of the extracts towards cells derived from healthy tissue (MRC-5) and tumor cells (HT-29) was monitored by alkaline comet assay. The effect of the extracts on cell growth and cell death was examined in one normal (MRC-5) and three tumor (HT-29, MCF7 and HeLa) cell lines.

Finally, an attempt was made to correlate biological activities with chemical composition.

The results of *headspace* GC-MS analysis of volatiles formed in alliinase catalyzed reaction, revealed that dimethyl disulfide is the major volatile compound, which indicates that methiin is the dominant ACSO in species belonging to *Codonoprasum* section. The characteristic GC-MS chromatograms obtained for investigated species can be used to differentiate them from other species of the genus *Allium* during chemotaxonomic determination.

By LC-DAD-MS and LC-MS-MS qualitative analysis of methanol extracts forty four compounds were detected, among which twenty nine were preliminarily identified. Twenty five of these compounds belong to flavonoids, wherein quercetin derivatives are the most dominant (twelve quercetin glycosides and nine methylquercetin glycosides). The remaining four compounds were kaempferol or luteolin glycosides. There was no significant difference in qualitative composition between the samples of the same species from different locations, but only small difference in the content of certain compounds, suggesting that phenolic compounds are reliable and stable chemotaxonomic markers. Rutin is present in a particularly high amount in *A. melanantherum*, *A. flavum* and *A. fuscum* extracts. The content of flavonoids in *A. rhodopeum* extracts was very low, while in *A. oleraceum* extract flavonoids are not detected at all.

The content of 44 selected phenolic compounds and quinic acid in aerial parts extracts and bulbs extracts of investigated taxa was determined by LC-MS/MS. The total content of quantified compounds was significantly higher in the aboveground parts of plants than in bulbs (6.09–271 mg g⁻¹ dw and 0.76–2.85 mg g⁻¹ dw, respectively). There was no significant difference in qualitative composition of samples of the same taxa from different localities, but the variability in the quantitative composition was very high. The dominant flavonoids were quercetin glycosides (rutin, hyperoside, isoquercitrin, isorhamnetin), as well as the kaempferol-3-O-glucoside (astragalin). The results of PCA analysis showed that *A. melanantherum* extracts are separated from others primarily due to the high content of rutin and low content of quercetin-3-O-glucoside, while the high levels of rutin and quercetin-3-O-glucoside separate *A. flavum* extracts. On the contrary, *A. pallens* and *A. oleraceum*, unlike other species, do not contain rutin, but contain a considerable amount of hyperoside. That could be important from chemotaxonomic point of view. *A. rhodopeum* extract is characterized by extremely low content of all the investigated phenolic compounds (total phenolic content in the aerial parts extract is 6 mg g⁻¹ dw). Astragalin and isoquercitrin are present in significant amounts in all aerial parts extracts (0.89–57.2 mg g⁻¹ dw and 0.16–5.81 mg g⁻¹ dw, respectively). Aglycones quercetin, kaempferol and isorhamnetin are present in most of the studied species, but in very small amounts.

The total content of monomeric anthocyanins in inflorescence extracts of species from sect. *Codonoprasum* ranged from 10.7 to 969 mg equivalents of cyanidin-3-glucoside g⁻¹ dw, with the highest content in extracts of both subspecies of *A. carinatum*. Extracts of *A. rhodopeum*, *A. paniculatum* and *A. melanantherum* also contained a substantial amount of anthocyanins (91.3–294 mg eq. cyanidin-3-glucoside g⁻¹ dw), while the content of these compounds in extracts of other species was very low (10.7–111 mg eq. cyanidin-3-glucoside g⁻¹ dw).

The activity of alliinase (enzyme that catalyzes the transformation of *S*-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide in thiosulfates – the compounds responsible for characteristic smell and taste of onions), was high in all investigated species.

In antioxidant assays, the extracts of *A. flavum*, *A. fuscum* var. *fuscum*, *A. oleraceum* and *A. paniculatum* expressed strong scavenging capacity towards DPPH[•], ABTS^{•+} and NO radicals and the ability to inhibit LP, indicating the presence of compounds with high reducing potential, or electron-donating properties. On the other hand, the extracts of *A. pallens*, *A. fuscum* and *A. rhodopeum* showed the highest OH[•]-RSC, indicating the presence of compounds with distinct chelating properties in the extracts. In most assays, onion extract showed stronger antioxidant activity in comparison to whole plant extracts of all investigated species from *Codonoprasum* section, while the activity of these extracts was significantly lower than the activity of synthetic antioxidant BHA.

Anti-inflammatory activity was evaluated by monitoring the effect of the extracts on COX-1 and 12-LOX branches enzymes of arachidonic acid metabolic pathway in human platelets, using the LC-MS/MS technique. Whole plant extracts of investigated species showed dose-dependent inhibitory activity on production of 12-HHT, TXB₂, PGE₂ and 12-HETE. IC₅₀ values for 12-HHT were in the range of 0.70 mg mL⁻¹–4.68 mg mL⁻¹, for TXB₂ 0.63 mg mL⁻¹–5.35 mg mL⁻¹, for PGE₂ 0.57 mg mL⁻¹–7.99 mg mL⁻¹, and for 12-HETE 0.08 mg mL⁻¹–11.99 mg mL⁻¹. The strongest anti-inflammatory activity was exhibited by aerial parts extract of *A. flavum* and whole plant extracts of *A. rhodopeum*, *A. oleraceum*, *A. paniculatum* and *A. cepa*. Compared with known COX-1 inhibitor aspirin and 12-LOX inhibitor quercetin, the extracts showed lower ability to inhibit eicosanoids production, but their inhibitory activity was comparable with the activity of *Plantago major* L., the well-known anti-inflammatory drug. It was found that the aerial parts extract of *A. flavum* in concentrations lower than 0.25 mg mL⁻¹ acts as a selective 12-LOX inhibitor. Inhibitory effect of

investigated extracts on cyclooxygenase pathway enzymes could be useful in the prevention and treatment of diseases that arise as a consequence of chronic inflammation, while inhibitory potential on platelet 12-(S)-lipoxygenase could be applied in prevention and treatment of cancer, psoriasis, rheumatoid arthritis and atherosclerosis.

Among all investigated extracts, only *A. melanantherum* extract showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* in the disc diffusion assay, while minimum bactericidal concentration (MBC) for this extract, determined by dilution method, was 15.4 mg mL⁻¹. Antibacterial activity of *A. melanantherum* extract can be explained by the extremely high content of rutin. Extracts of *A. fuscum* subsp. *fuscum*, *A. paniculatum*, *A. rhodopeum*, *A. melantherum*, *A. cepa* and *A. sativum* did not exhibit antiviral activity towards examined bacteriophages even at concentration of 40 mg mL⁻¹, while standard quercetin showed weak anti-viral activity (PhI₅₀=108 µg mL⁻¹).

Antimutagenic activity was investigated by measuring their protective effect on spontaneous and induced oxidative mutagenesis in the bacterium *Escherichia coli* WP2. The aerial parts extract of *A. melanantherum* did not show protective effect neither on spontaneous nor on induced mutagenesis in the concentration range tested (0.1–4 mg per Petri dish). *A. flavum* extract at lower concentrations (0.1 and 0.5 mg per Petri dish) showed weak antimutagenic effect on induced mutagenesis (inhibition of mutagenesis 18% and 33%, respectively), thus inhibiting the action of *t*-BOOH. However, at higher concentrations, this effect was not recorded. These results indicate that in the presence of *t*-BOOH, aerial parts extract of *A. flavum* can even act as a prooxidant at higher concentrations, which limiting possible application of the extract to low concentrations. The extract of *A. carinatum* subsp. *carinatum*, did not show antimutagenic but poorly pro-mutagenic effect on spontaneous and induced mutagenesis.

The genotoxic effect of whole plant extracts of *A. flavum*, *A. melanantherum*, *A. rhodopeum*, *A. carinatum* subsp. *pulchelum*, *A. paniculatum* and aerial parts extract of *A. flavum* was tested on normal human lung fibroblasts (MRC-5) and colon cancer cells (HT-29). For the DNA damage detection the single cell electrophoresis assay or alkaline comet test was used. The aerial parts extract of *A. flavum* at a concentration of 15 mg mL⁻¹ showed a weak genotoxic effect on lung fibroblasts, whereas in colon adenocarcinoma cells did not induce DNA strand breaks. This suggests caution in case of possible application of this extract for medicinal purposes and the necessity of the strict definition of non toxic dose. Other investigated extracts did not cause DNA damages in the tested cell lines, which suggests that their use in concentrations lower than tested is safe.

Antiproliferative activity of methanol extracts was tested against one healthy (fetal lung fibroblasts - MRC-5) and three tumor cell lines (human cervix epidermoid carcinoma - HeLa, human breast adenocarcinoma - MCF7, colon adenocarcinoma - HT-29), using a sulforhodamine B (SRB) assay. The activity of standard compounds - ferulic and caffeic acids, quercetin, kaempferol and rutin was also tested. Most of the extracts demonstrated the antiproliferative activity, but the level of activity depended on the type of cell line and extract concentration. HT-29 cells were the most resistant to both the standards and the extracts. In comparison with commercial antitumor drugs Doxorubicin® and Gemcitabine®, the extracts expressed weaker antiproliferative effect. However, the drugs were much more toxic to healthy than to tumor cells.

The most pronounced inhibitory effect on tumor cells growth was shown by aerial parts extract of *A. flavum*, reaching the lowest IC₅₀ values for breast adenocarcinoma cells (25.4 mg mL⁻¹), but it also inhibited the growth of fetal fibroblasts. Preferred non-tumor/tumor ratios (> 1) were observed for whole plants extracts of *A. rhodopeum*, *A. paniculatum* and *A. flavum* and the aerial parts extract of *A. melanantherum*, which favours their potential application in antitumor therapy.

Extracts of *A. carinatum*, *A. fuscum*, *A. pallens*, *A. oleraceum* expressed poor anti-proliferative activity (IC_{50} values in the range from 250–880 mg mL⁻¹), while *A. cepa* and *A. sativum* extracts did not affect cells growth in concentrations tested (62.5–1000 mg mL⁻¹). Among the investigated standard compounds, the strongest antiproliferative activity against all four cell lines expressed kaempferol, quercetin and caffeic acid, indicating that the presence of these compounds in the extracts is partially responsible for their cytotoxic activity. Rutin did not express antiproliferative effect, which means that an enormous amount of routine in certain extracts does not contribute to cytotoxic activity.

Ability of extracts to induce cell death (as well as determination of cell death type) was assayed by Cell Death Detection ELISA^{PLUS} kit. Extracts with significant antiproliferative activity ($IC_{50}=100 \mu\text{g mL}^{-1}$) were chosen for investigation. Most of the extracts induced death in tumor cell lines. Extracts of *A. flavum* and the aerial parts extract of *A. rhodopeum*, significantly induced apoptosis in HeLa and/or HT-29 cells, but the induction of cell death in normal cells was even higher, which significantly reduces their potential in tumor therapy. On the other hand, the aerial parts extract of *A. melanantherum* induced apoptosis and decreased necrosis in MCF7 cells (EFA=2.46 and EFN=0.58), with no effect on MRC-5 cells. Also, the whole plant extract of *A. paniculatum* strongly induced cell death in HT-29 cells, with an increase of apoptosis twice higher than increase of necrosis (EF = 21.7 and EFN = 9.92), and without effect on healthy cells. The whole plant extract of *A. rhodopeum* induced apoptosis in HT-29 and HeLa cells, whereas the cells of healthy tissues were not affected. The obtained results suggest that whole plant extracts of *A. paniculatum* and *A. rhodopeum*, as well as aerial parts extracts of *A. melanantherum* have a high potential for application in antitumor therapy.

Summing up all the results obtained, it can be concluded that species of genus *Allium* sect. *Codonoprasum* are rich sources of biologically active compounds with a broad spectrum of biological activities. Dimethyl disulfide is the most dominant and often the only volatile component of most species, which is significant from chemotaxonomic point of view. The methanol extracts of investigated species contain high levels of flavonoids (primarily quercetin derivatives). Specificity of *A. pallens* and *A. oleraceum* extracts is that they do not contain rutin, but contain hyperoside, while small quantity of phenolic compounds is characteristic for *A. rhodopeum* extract. All investigated species, except of *A. flavum*, are rich in anthocyanins. Alliinase activity was high in all examined species. Most of the extracts, except *A. carinatum* and *A. melanantherum* extracts, express considerable antioxidant activity, while extracts of *A. flavum*, *A. rhodopeum*, *A. paniculatum* and *A. oleraceum* are potent anti-inflammatory agents. The investigated *Allium* extracts did not show antimicrobial and antimutagenic activity. Also, the extracts did not express genotoxic effect on healthy tissue cells (except the weak genotoxic effects of aerial parts extract of *A. flavum*), indicating that the use of these species as a food or as a drug is safe. Whole plant extracts of *A. paniculatum* and *A. rhodopeum*, as well as aerial parts extract of *A. melanantherum* showed strong antiproliferative activity (with a favorable non-tumor/tumor ratios) and induced apoptosis in tumor cells, suggesting that these plants have a high potential for application in antitumor therapy.

7. Literatura

- African pharmacopoeia (1985). Vol. 1, 1st ed. Organization of African Unity, Scientific, Technical & Research Commission. Lagos, Nigeria.
- Seyoum, A., Asres, K., Kandeel El-Fiky, F. (2006). Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 67, 2058–2070.
- Primiano, T., Sutter, R.T., Kensler, W.T. (1997). Redox Regulation of Genes that Protect Against Carcinogens. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118B, 487–497.
- McCall, R.M., Frei, B. (1999). Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Rad. Biol. Med.*, 26, 1034–1053.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., Tattini, M. (2012). Plant science flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science*, 196, 67–76.
- Aggarwal, B. B., Shishodia, S. (2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical Pharmacology*, 71, 1397–1421.
- Ahmed, N., Laverick, L., Sammons, J. (2000). Ajoene, a garlic-derived natural compound, enhances chemotherapy-induced apoptosis in human myeloid leukaemia CD34-positive resistant cells. *Anticancer Research*, 21, 3519–3523.
- Ali, A. M., Mackeen, M. M., EI-Sharka, S. H. (1996). Antiviral and cytotoxic activities of some plants used in malaysian indigenous medicine. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 19, 129–136.
- Ali, M., Thomson, M. (1995). Consumption of a garlic clove a day could be beneficial in preventing thrombosis. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 53, 211–212.
- Ali, M., Thomson, M., Afzal, M. (2000). Garlic and onions: their effect on eicosanoid metabolism and its clinical relevance. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 62, 55–73.
- Amagase, H. (2006). Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *The Journal of Nutrition*, 136, 716S–725S.
- Anačkov, G. (2003): Rod *Allium* L. 1754 (Amaryllidales, Alliaceae) u flori Vojvodine. Magistarska teza, Univerzitet u Novom Sadu.
- Anackov, G. (2009). Taksonomija i horologija roda *Allium* L. 1754 (Amaryllidales, Alliaceae) u Srbiji. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Srbija.
- Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., et al. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research*, 25, 2097–116.
- Andersen, Ø., Fossen, T. (1995). Anthocyanins with an unusual acylation pattern from stem of *Allium victorialis*. *Phytochemistry*, 40, 1809–1812.
- Anderson, J. J., Anthony, M. S., Cline, J. M., Washburn, S.A, Garner, S. C. (1999). Health potential of soy isoflavones for menopausal women. *Public Health Nutrition*, 2, 489–504.
- Andelković, M., Van Camp, J., De Meulenaer, B., Depaemelaere, G., Socaciu, C., Verloo, M., Verhe, R. (2006). Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chemistry*, 98, 23–31.
- Ankri, S., Mirelman, D. (1999). Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection*, 2, 125–129.
- Ankri, S., Miron, T., Rabinkov, A., Wilchek, M., Mirelman, D. (1997). Allicin from garlic strongly inhibits cysteine proteinases and cytopathic effects of *Entamoeba histolytica*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, 2286–2288.

- Anthon, G. E., Barrett, D. M. (2003). Modified method for the determination of pyruvic acid with dinitrophenylhydrazine in the assessment of onion pungency. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 1210–1213.
- APGIII. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants : APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161, 105–121.
- Arnault, I., Auger, J. (2006). Seleno-compounds in garlic and onion. *Journal of Chromatography A*, 1112, 23–30.
- Arora, A., Nair, G.M., Strasburg, M.G. (1998). Structure Activity Relationships for Antioxidant Activities of a Series of Flavonoids in a Liposomal System. *Free Radical Biology and Medicine*, 24, 1355–1363.
- Ashraf, R., Khan, R. A., Ashraf, I. (2011). Garlic (*Allium sativum*) supplementation with standard antidiabetic agent provides better diabetic control in type 2 diabetes patients. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24, 565–570.
- Aust SD. (1985). Lipid peroxidation. U: Greenwald RA. (ur.) Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Raton: CRC Press, str. 203-207.
- Azzini, E., Durazzo, A., Foddai, M. S., Temperini, O., Venneria, E., Valentini, S., Maiani, G. (2014). Phytochemicals content in Italian garlic bulb (*Allium sativum* L.) varieties. *Journal of Food Research*, 3, 26–32.
- Babich, H., Schuck, A. G., Weisburg, J. H., Zuckerbraun, H. L. (2011). Research strategies in the study of the pro-oxidant nature of polyphenol nutraceuticals. *Journal of Toxicology*, 2011, 1–12.
- Babich, H., Sedletcaia, A., Kenigsberg, B. (2002). *In vitro* cytotoxicity of protocatechuic acid to cultured human cells from oral tissue: involvement in oxidative stress. *Pharmacology & Toxicology*, 91, 245–253.
- Babovic, N., Djilas, S., Jadranin, M., Vajs, V., Ivanovic, J., Petrovic, S., Zizovic, I. (2010). Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs and their antioxidant capacity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11, 98–107.
- Bakht, J., Khan, S., Shafi, M. (2013). Antimicrobial potential of fresh *Allium cepa* against gram positive and gram negative bacteria and fungi. *Pakistan Journal of Botany*, 45, 1–6.
- Bakri, I. M., Douglas, C. W. I. (2005). Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Archives of Oral Biology*, 50, 645–651.
- Beara, I. N., Orcić, D. Z., Lesjak, M. M., Mimica-Dukić, N. M., Peković, B. A., Popović, M. R. (2010). Liquid chromatography/tandem mass spectrometry study of anti-inflammatory activity of plantain (*Plantago* L.) species. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 52, 701–706.
- Beato, V. M., Orgaz, F., Mansilla, F., Montaña, A. (2011). Changes in phenolic compounds in garlic (*Allium sativum* L.) owing to the cultivar and location of growth. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66, 218–223.
- Beecher, G. (2003). Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *The Journal of Nutrition*, 133, 3248–3254S.
- Bellion, P., Olk, M., Will, F., Dietrich, H., Baum, M., Eisenbrand, G., Janzowski, C. (2009). Formation of hydrogen peroxide in cell culture media by apple polyphenols and its effect on antioxidant biomarkers in the colon cell line HT-29. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, 1226–1236.
- Benetou, V., Orfanos, P., Lagiou, P., Trichopoulos, D., Boffetta, P., Trichopoulou, A. (2008). Vegetables and fruits in relation to cancer risk: evidence from the Greek EPIC cohort study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 17, 387–92.
- Benkeblia, N. (2004). Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *LWT - Food Science and Technology*, 37, 263–268.

- Berić, T., Nikolić, B., Stanojević, J., Vuković-Gaćić, B., Knezević-Vukcević, J. (2008). Protective effect of basil (*Ocimum basilicum* L.) against oxidative DNA damage and mutagenesis. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 724–32.
- Bernaert, N., De Loose, M., Van Bockstaele, E., Van Droogenbroeck, B. (2014). Antioxidant changes during domestic food processing of the white shaft and green leaves of leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 1168–1174.
- Bernaert, N., Wouters, D., De Vuyst, L., De Paepe, D., De Clercq, H., Van Bockstaele, E., et al. (2013). Antioxidant changes of leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*) during spontaneous fermentation of the white shaft and green leaves. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 2146–2153.
- Bhourri, W., Sghaier, M. Ben, Kilani, S., Bouhleb, I., Dijoux-Franca, M.-G., Ghedira, K., Ghedira, L. C. (2011). Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): kaempferol 3-O- β -isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O- β -isorhamninoside. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1167–73.
- Bianchini, F., Vainio, H. (2001). *Allium* vegetables and organosulfur compounds: do they help prevent cancer? *Environmental Health Perspectives*, 109, 893–902.
- Bjelland, S., Seeberg, E. (2003). Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutation Research*, 531, 37–80.
- Blanco, M., Urios, A., Martinez, A. (1998). New *Escherichia coli* WP2 tester strains highly sensitive to reversion by oxidative mutagens. *Mutation Research*, 413, 95–101.
- Block, E. (2009). Garlic and other Alliums: the lore and the science. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, ISBN: 978-0-85404-190-9.
- Block, E., Birringer, M., Jiang, W., Nakhodo, T., Thompson, H. J., Toscano, P. J., et al. (2001). *Allium* chemistry: synthesis, natural occurrence, biological activity, and chemistry of S-alk(en)ylselenocysteines and their gamma-glutamyl derivatives and oxidation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 458–470.
- Block, G., Patterson, B., Subar, A. (1992). Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer*, 18, 1–29.
- Blumenthal, M., Busse, W.R., Goldberg, A., Gruenwald, J., Hall, T., Riggins, C.W., Rister, R.S. (1999): The complete German commission E monographs. American Botanical Council, Austin.
- Bogdanovic, S., Brullo, S., Mitic, B., Salmeri, C. (2008). A new species of *Allium* (Alliaceae) from Dalmatia, Croatia. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 158, 106–114.
- Boivin, D., Lamy, S., Lord-Dufour, S., Jackson, J., Beaulieu, E., Côté, M., et al. (2009). Antiproliferative and antioxidant activities of common vegetables: a comparative study. *Food Chemistry*, 112, 374–380.
- Bonaccorsi, P., Caristi, C., Gargiulli, C., Leuzzi, U. (2005). Flavonol glucoside profile of southern Italian red onion (*Allium cepa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2733–2740.
- Bora, K., Sharma, A. (2009). Phytoconstituents and therapeutic potential of *Allium cepa* Linn.– a review. *Pharmacognosy Reviews*, 3, 170–180.
- Boudet, A.M. (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, 68, 2722–35.
- Bouic, P. J. D. (2002). Sterols and sterolins: new drugs for the immune system? *Drug Discovery Today*, 7, 775–778.
- Božin, B. (2009): Biohemijska i farmakološka ispitivanja vrsta roda *Allium* L. (sect. *Allium*). Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Srbija.
- Božin, B., Mimica-Dukić, N., Samojlik, I., Goran, A., Igić, R. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chemistry*, 111, 925–929.

- Breu, W. (1996). *Allium cepa* L. (onion). Part 1: Chemistry and analysis. *Phytomedicine*, 3, 293–306.
- Brewster, L.J., Rabinowich, D.H. (1990): Onions and allied crops, Volume III-Biochemistry flavour, food science and minor crops. CRC Press, Boca Raton Florida.
- British herbal pharmacopoeia (1990). Vol. 1. British Herbal Medicine Association, London, UK.
- Brodnitz, M., Pascale, J. (1971). Thiopropanal S-oxide: a lachrymatory factor in onions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 19, 269–272.
- Bruce A. Bohm, B.A., Stuessy T. F. (2001). Flavonoids of the sunflower family (Asteraceae), Springer-Verlag, Wien, Austria.
- Brullo, S., Giusso, G., Terrasi, M. (2008). *Allium aeginiense* Brullo, Giusso & Terrasi (Alliaceae), a new species from Greece. *Candollea*, 63, 197–203.
- Brullo, S., Guglielmo, A. (2003). Three new species of *Allium* sect. *Codonoprasum* from Greece. *Plant Biosystems*, 137, 1–10.
- Brullo, S., Guglielmo, A., Terrasi, M. (1998). Notes on *Allium rhodopeum* (Alliaceae), a neglected species from the E Mediterranean area. *Plant Biosystems*, 132, 63–69.
- Brullo, S., Pavone, P., Salmeri, C. (1997). *Allium oporinanthum* (Alliaceae), a new species from the NW Mediterranean area. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 55, 297–302.
- Buckingham, J. (ur.) (2007). Dictionary of natural products. version 15.1 on CD-ROM, Chapman & Hall/CRC Press, London, New York.
- Burgoyne, L.A., Hewish D.R., Mobbs, J. (1974): Mammalian Chromatin Substructure Studies with the Calcium-Magnesium Endonuclease and Two-Dimensional Polyacrylamide-Gel Electrophoresis. *Biochem. J.*, 143: 67-72.
- Cadenas, E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual review of biochemistry*, 58, 79–110.
- Calder, P. C. (2005). Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Biochemical Society Transactions*, 33, 423–427.
- Calpe-Berdiel, L., Escolà-Gil, J. C., Blanco-Vaca, F. (2009). New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism. *Atherosclerosis*, 203, 18–31.
- Carlson, K. (2005). Working with bacteriophages: common techniques and methodological approaches. U: Kutter, E., Sulakvelidze, A. (ur.), *Bacteriophages: Biology and Applications*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Carotenuto, A., De Feo, V., Fattorusso, E., Lanzotti, V., Magno, S., Cicala, C. (1996). The flavonoids of *Allium ursinum*. *Phytochemistry*, 41, 531–536.
- Carotenuto, A., Fattorusso, E., Lanzotti, V., Magno, S., Feo, V., Cical, C. (1997). The flavonoids of *Allium neapolitanum*. *Phytochemistry*, 44, 949–957.
- Cavallito, C., Bailey, J. (1944). Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum* L. Isolation, physical properties and antibacterial action. *Journal of the American Chemical Society*, 66, 1950–1951.
- Cellini, L., Campi, E., Masulli, M., Bartolomeo, S. Di, Allocati, N. (1996). Inhibition of *Helicobacter pylori* by garlic extract (*Allium sativum*). *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 13, 273–277.
- Četojević-Simin, D. D., Velićanski, A. S., Cvetković, D. D., Markov, S. L., Četković, G. S., Tumbas Šaponjac, V. T., et al. (2015). Bioactivity of Meeker and Willamette raspberry (*Rubus idaeus* L.) pomace extracts. *Food Chemistry*, 166, 407–413.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H., Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods, 10, 178–182.

- Chase, M. W., Reveal, J. L., Fay, M. F. (2009). A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161, 132–136.
- Chen, C-H., Chou, T-W., Cheng, L-H., Ho, C-W. (2011). *In vitro* anti-adenoviral activity of five *Allium* plants. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42, 228–232.
- Chiao, C., Carothers, A., Grunberger, D. (1995). Apoptosis and altered redox state induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in transformed rat fibroblast cells. *Cancer Research*, 55, 3576–3583.
- Choi, H., Song, J., Park, K., Kwon, D. (2009). Inhibitory effects of quercetin 3-rhamnoside on influenza A virus replication. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37, 329–333.
- Chowdhury, A., Ahsan, M., Islam, S., Ahmed, Z. (1991). Efficacy of aqueous extract of garlic and allicin in experimental shigellosis in rabbits. *The Indian Journal of Medicinal Research*, 93, 33–36.
- Christensen, R.E., Beckman, R.M., Bridesall, J.J. (1968): Some mineral elements of commercial spices and herbs as determined by direct reading emission spectroscopy. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 51: 1003-1008.
- Christofferson, D., Yuan, J. (2010). Cyclophilin A release as a biomarker of necrotic cell death. *Cell Death and Differentiation*, 17, 1942–1943.
- Chun, H., Kim, H., Choi, E. (2001). Modulation of cytochrome P450-mediated bioactivation of benzo pyrene by volatile allyl sulfides in human hepatoma cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65, 2205–2212.
- Chungsamarnyart, N., Sirinarumit, T., Chumsing, W., Wajjawalku, W. (2007). *In vitro* study of antiviral activity of plant crude-extracts against the foot and mouth disease virus. *Kasetsart Journal - Natural Science*, 41, 97–103.
- Corea, G., Fattorusso, E., Lanzotti, V., Capasso, R., Izzo, A. A. (2005). Antispasmodic saponins from bulbs of red onion, *Allium cepa* L. var. Tropea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 935–940.
- Corzo-Martinez, M., Corzo, N., Villamiel, M. (2007). Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 609–625.
- Cragg, G. M., Newman, D. J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830, 3670–95.
- Crawford D. J., Giannasi D. E. (1982): Plant chemosystematics. *BioScience*, 32: 114-124.
- Crawford, D., Mabry, T. (1978). Flavonoid chemistry of *Chenopodium fremontii*. Intraspecific variation and systematic implications at the interspecific level. *Biochemical Systematics and Ecology*, 6, 189–192.
- Curcic, M. G., Stankovic, M. S., Radojevic, I. D., Stefanovic, O. D., Comic, L. R., Topuzovic, M. D., *et al.* (2012). Biological effects, total phenolic content and flavonoid concentrations of fragrant yellow onion (*Allium flavum* L.). *Medicinal Chemistry*, 8, 46–51.
- Cushnie, T. P. T., Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343–356.
- Davies, D. (1992). Alliums: the ornamental onions, Timber Press, Portland, USA.
- Davis, L., Shen, J., Royer, R. (1994). *In vitro* synergism of concentrated *Allium sativum* extract and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. *Planta Medica*, 60, 546–549.
- Dedon, P. C., Plastaras, J. P., Rouzer, C. A., Marnett, L. J. (1998). Indirect mutagenesis by oxidative DNA damage: formation of the pyrimidopurinone adduct of deoxyguanosine by base propenal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 11113–11116.
- Delaha, E. C., Garagusi, V. F. (1985). Inhibition of mycobacteria by garlic extract (*Allium sativum*). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 27, 485–486.

- Deveraux, Q., Reed, J. (1999). IAP family proteins—suppressors of apoptosis. *Genes & Development*, 13, 239–252.
- Dewick, P. M. (2009). *Medicinal natural products: A biosynthetic approach*, John Wiley & Sons Ltd, Chippenham, UK.
- Ding, X. Z., Hennig, R., Adrian, T. E. (2003). Lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism: new insights in treatment and chemoprevention of pancreatic cancer. *Molecular Cancer*, 2, 10.
- Dirsch, V. M., Gerbes, A. L., Vollmar, A. M. (1998). Ajoene, a compound of garlic, induces apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by generation of reactive oxygen species and activation of nuclear factor κ B. *Molecular Pharmacology*, 53, 402–407.
- Dirsch, V., Vollmar, A. (2001). Ajoene, a natural product with non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-like properties? *Biochemical Pharmacology*, 61, 587–593.
- Dixon, R. A., Ferreira, D. (2002). Genistein. *Phytochemistry*, 60, 205–11.
- Dixon, R., Steele, C. (1999). Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Plant Science*, 4, 394–400.
- Djordjevic, L., Dinic, A., Pavlovic, P., Mitrovic, M., Karadzic, B., Tesevic, V. (2004). Allelopathic potential of *Allium ursinum* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 533–544.
- Dorant, E., Brandt, P. A., Goldbohm, R. A., Sturmans, F. (1996). Consumption of onions and a reduced risk of stomach carcinoma. *Gastroenterology*, 110, 12–20.
- Dostál, J. (1989): *Nová Květena ČSSR*, 2: 1214-1224. Academia, Praha.
- El-Bayoumy, K., Chae, Y., Upadhyaya, P., Ip, C. (1996). Chemoprevention of mammary cancer by diallyl selenide, a novel organoselenium compound. *Anticancer Research*, 16, 2911–2915.
- El-Bayoumy, K., Sinha, R., Pinto, J. T., Rivlin, R. S. (2006). Cancer chemoprevention by garlic and garlic-containing sulfur and selenium compounds. *The Journal of Nutrition*, 136, 864S–869S.
- El-Demerdash, F. M., Yousef, M. I., Abou El-Naga, N. I. (2005). Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 57–63.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35, 495–516.
- Elnima, E. I., Ahmed, S. A., Mekkawi, A. G., Mossa, J. S. (1983). The antimicrobial activity of garlic and onion extracts. *Pharmazie*, 38, 747–748.
- Emerenciano, V. P., Militão, J. S. L. T., Campos, C. C., Romoff, P., Kaplan, M. A. C., Zambon, M., Brant, A. J. C. (2001). Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. *Biochemical systematics and ecology*, 29, 947–957.
- Erel, O. (2004): A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry*, 37, 277–285.
- Erlejan, A. G., Jagers, G., Fraga, C. G., Oteiza, P. I. (2008). TNF α -induced NF- κ B activation and cell oxidant production are modulated by hexameric procyanidins in Caco-2 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476, 186–195.
- Essokne, R. S., Grayer, R. J., Porter, E., Kite, G. C., Simmonds, M. S. J., Jury, S. L. (2012). Flavonoids as chemosystematic markers for the genus *Adenocarpus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 42, 49–58.
- European Pharmacopoeia 6th edition Supplement 6.1 (2007). European Directorate for the Quality of Medicines - Council of Europe (COE), Strasbourg Cedex, France.
- European pharmacopoeia, 3rd edition (1997). Council of Europe, Strasbourg, France.

- Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., Walker, R. B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8139–44.
- Fan, D., Zhou, X., Zhao, C., Chen, H., Zhao, Y., Gong, X. (2011). Anti-inflammatory, antiviral and quantitative study of quercetin-3-O- β -D-glucuronide in *Polygonum perfoliatum* L. *Fitoterapia*, 82, 805–10.
- Fattorusso, E., Iorizzi, M., Lanzotti, V., Tagliatalata-Scafati, O. (2002). Chemical composition of shallot (*Allium ascalonicum* Hort.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5686–90.
- Fattorusso, E., Lanzotti, V., Tagliatalata-Scafati, O. (1999). Antifungal N-feruloyl amides from roots of two *Allium* species. *Plant Biosystems*, 133, 199–203.
- Fattorusso, E., Lanzotti, V., Tagliatalata-Scafati, O., Cicala, C. (2001). The flavonoids of leek, *Allium porrum*. *Phytochemistry*, 57, 565–569.
- Fenwick, G. R., Hanley, A. B. (1990). Chemical composition. U: Brewster, L.J., Rabinowich, D.H. (ur). Onions and allied crops, Vol. 3. CRC Press, Boca Raton Florida.
- Ferreres, F., Gil, M., Tomás-Barberán, F. (1996). Anthocyanins and flavonoids from shredded red onion and changes during storage in perforated films. *Food Research International*, 29, 389–395.
- Fesen, M., Kohn, K., Leteurtre, F., Pommier, Y. (1993). Inhibitors of human immunodeficiency virus integrase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 2399–2403.
- Filomeni, G., Aquilano, K., Rotilio, G., Ciriolo, M. (2003). Reactive oxygen species-dependent c-Jun NH2-terminal kinase/c-Jun signaling cascade mediates neuroblastoma cell death induced by diallyl disulfide. *Cancer Research*, 63, 5940–5949
- Fimognari, C., Lenzi, M., Hrelia, P. (2009). Apoptosis induction by sulfur-containing compounds in malignant and nonmalignant human cells. *Environmental and molecular mutagenesis*, 189, 171–189.
- Fischer, K., Voelkl, S., Berger, J., Andreesen, R., Pomorski, T., Mackensen, A. (2006). Antigen recognition induces phosphatidylserine exposure on the cell surface of human CD8⁺ T cells. *Blood*, 108, 4094–101.
- Fleischauer, A., Arab, L. (2001). Garlic and cancer: a critical review of the epidemiologic literature. *The Journal of nutrition*, 131, 1032S–1040S.
- Fleischhut, J., Kratzer, F., Rechkemmer, G., Kulling, S. E. (2006). Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *European Journal of Nutrition*, 45, 7–18.
- Flick, D., Gifford, G. (1984). Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *Journal of Immunological Methods*, 68, 167–175.
- Fossen, T., Andersen, Ø. (1997). Malonated anthocyanins of garlic *Allium sativum* L. *Food Chemistry*, 58, 215–217.
- Fossen, T., Andersen, Ø. M., Øvstedal, D. O., Pedersen, A. T., Raknes, Å. (1996). Characteristic anthocyanin pattern from onions and other *Allium* spp. *Journal of Food Science*, 61, 703–706.
- Fossen, T., Pedersen, A., Andersen, Ø. (1998a). Flavonoids from red onion (*Allium cepa*). *Phytochemistry*, 47, 281–285.
- Fossen, T., Cabrita, L., Andersen, O. (1998b). Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chemistry*, 63, 435–440.
- Francis, F. J. (1989). Food colorants: anthocyanins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28, 273–314.
- Friesen, N., Fritsch, R., Blattner, F. (2006). Phylogeny and new intrageneric classification of *Allium* (Alliaceae) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *Aliso*, 22, 372–395.
- Fritsch, R. M., Friesen, N. (2002). Evolution, domestication and taxonomy. U Rabinowitch H., Currah L. (ur.), *Allium crop science: recent advances*. CABI Publishing, Wallingford, UK, str. 5–30.

- Fritsch, R. M., Keusgen, M. (2006). Occurrence and taxonomic significance of cysteine sulphoxides in the genus *Allium* L. (Alliaceae). *Phytochemistry*, 67, 1127–1135.
- Fu, H. (2004). Free radical scavenging and leukemia cell growth inhibitory properties of onion powders treated by different heating processes. *Journal of Food Science*, 69(1), 50–54.
- Fujii, T., Maeda, M., Kawashima, Y. (1987). A simple and rapid crystal violet uptake sensitivity test for anticancer agents. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 39, 352–358.
- Galluzzi, L., Aaronson, S., Abrams, J., Alnemri, E., Andrews, D., Baehrecke, E., *et al.* (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death and Differentiation*, 16, 1093–1107.
- Gao, C., Takezaki, T., Ding, J., Li, M., Tajima, K. (1999). Effect of *Allium* vegetables against both esophageal and stomach cancer: a simultaneous case-referent study of a high-epidemic area in Jiangsu province, China. *Japanese Journal of Cancer Research*, 90, 614–621.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology*, 119, 493–501.
- Gedik, N., Kabasakal, L., Sehirli, O., Ercan, F., Sirvanci, S., Keyer-Uysal, M., Sener, G. (2005). Long-term administration of aqueous garlic extract (AGE) alleviates liver fibrosis and oxidative damage induced by biliary obstruction in rats. *Life Sciences*, 76, 2593–2606.
- Geng, Z., Rong, Y., Lau, B. (1997). S-allyl cysteine inhibits activation of nuclear factor kappa B in human T cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 23, 345–350.
- Gennaro, L., Leonardi, C., Esposito, F., Salucci, M., Maiani, G., Quaglia, G., Fogliano, V. (2002). Flavonoid and carbohydrate contents in Tropea red onions: effects of homelike peeling and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1904–1910.
- Gillies, R. J., Didier, N., Denton, M. (1986). Determination of cell number in monolayer cultures. *Analytical Biochemistry*, 159, 109–113.
- Gorinstein, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Namiesnik, J., Najman, K., Drzewiecki, J. *et al.* (2008). Comparison of the main bioactive compounds and antioxidant activities in garlic and white and red onions after treatment protocols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4418–26.
- Gornall R. J., Bohm B. A., Dahlgren R. (1979). The distribution of flavonoids in the angiosperms. *Botaniska Notiser*, 132, 1-30.
- Goryachenkova, E.V. (1952). Enzyme in garlic which forms allicin (alliinase), a protein with phosphopyridoxal. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 87, 457–460.
- Govaerts, R. (2006): World CheckList Series. Royal Botanical Garden, Kew, UK. el. version. (<http://apps.kew.org/wcsp/about.do>)
- Green, L., Wagner, D., Glogowski, J., Skipper, P., Wishnok, J., Tannenbaum, S. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 126, 131–138.
- Green, M. H., Muriel, W. J. (1976). Mutagen testing using TRP⁺ reversion in *Escherichia coli*. *Mutation research*, 38, 3–32.
- Grégrová, A., Čížková, H., Bulantová, I., Rajchl, A., Voldřich, M. (2013). Characteristics of garlic of the Czech origin. *Czech Journal of Food Sciences*, 31, 581–588.
- Grlić, Lj. (1986). Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. August Cesarec, Zagreb.
- Gupta, R., Singh, M., Sharma, A. (2003). Neuroprotective effect of antioxidants on ischaemia and reperfusion-induced cerebral injury. *Pharmacological Research*, 48, 209–215.
- Gurushidze, M., Mashayekhi, S., Blattner, F. R., Friesen, N., Fritsch, R. M. (2007). Phylogenetic relationships of wild and cultivated species of *Allium* section *Cepa* inferred by nuclear rDNA ITS sequence analysis. *Plant Systematics and Evolution*, 269, 259–269.

- Guyonnet, D., Belloir, C., Suschetet, M., Siess, M. H., Le Bon, A. M. (2001). Antimutagenic activity of organosulfur compounds from *Allium* is associated with phase II enzyme induction. *Mutation Research*, 495, 135–45.
- Haddad, A. Q., Venkateswaran, V., Viswanathan, L., Teahan, S. J., Fleshner, N. E., Klotz, L. H. (2006). Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 9, 68–76.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1985): Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford.
- Hammer, Ø, Harper, D.A.T., Ryan, P.D. (2001). PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*, 4, 1–9.
- Han, M. H., Lee, W. S., Jung, J. H., Jeong, J.-H., Park, C., Kim, H. J. *et al.* (2013). Polyphenols isolated from *Allium cepa* L. induces apoptosis by suppressing IAP-1 through inhibiting PI3K/Akt signaling pathways in human leukemic cells. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 382–9.
- Hansen, S. (2001). Content of free amino acids in onion (*Allium cepa* L.) as influenced by the stage of development at harvest and long-term storage. *Acta Agriculturae Scandinavica. Section B: Soil and Plant Science*, 51, 77–83.
- Harborne, J. B. (1977). Flavonoids and the evolution of the angiosperms. *Biochemical Systematics and Ecology*, 5, 7–22.
- Harborne, J. B. (1998). Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis (3rd edition). Chapman & Hall: London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras.
- Harborne, J.B., Williams, C.A. (1996): Notes on flavonoid survey. U: Mathew, B. (ur.) A Review of *Allium* section *Allium*: 41-44. Royal Botanic Garden, Kew, UK.
- Harborne, J. B., Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481–504.
- Harris, J., Cottrell, S., Plummer, S., Lloyd, D. (2001). Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 282–286.
- Hassan, H. (2004). Ajoene (natural garlic compound): a new anti-leukaemia agent for AML therapy. *Leukemia Research*, 28, 667–671.
- Hayek, A. (1933): Prodrromus Florae peninsulae Balcanicae 3, Verlag des Repertoriums, Dahlem bei Berlin, str. 39-60.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572–584.
- Hengartner M. O. (2001): Apoptosis: DNA destroyers. *Nature*, 412, 27–29.
- Herman-Antosiewicz, A., Singh, S. V. (2004). Signal transduction pathways leading to cell cycle arrest and apoptosis induction in cancer cells by *Allium* vegetable-derived organosulfur compounds: a review. *Mutation Research*, 555, 121–131.
- Hindler, J. (1995). Special Antimicrobial Susceptibility Tests. U: Mahon, C.R., Manuselis, G (ur.): Textbook of Diagnostic Microbiology. Saunders, Philadelphia, str. 89-96.
- Hirose, M., Takahashi, S., Ogawa, K., Futakuchi, M., Shirai, T. (1999). Phenolics: blocking agents for heterocyclic amine-induced carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 985–992.
- Hong, Y., Ham, Y., Choi, J., Kim, J. (2000). Effects of allyl sulfur compounds and garlic extract on the expressions of Bcl-2, Bax, and p53 in non small cell lung cancer cell lines. *Experimental and Molecular Medicine*, 32, 127–134.
- Hosono, T., Fukao, T., Ogihara, J., Ito, Y., Shiba, H., Seki, T., Ariga, T. (2005). Diallyl trisulfide suppresses the proliferation and induces apoptosis of human colon cancer cells through oxidative modification of beta-tubulin. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 41487–93.

- Hostettmann K. (1991). Assays for immunomodulation and effects on mediators of inflammation. U: Dey PM., Harborne JB. (ur.) *Methods in Plant Biochemistry* vol. 6, London: Academic Press Limited, str. 207–211.
- Hsing, A. W., Chokkalingam, A. P., Gao, Y.T., Madigan, M. P., Deng, J., Gridley, G., Fraumeni, J. F. (2002). *Allium* vegetables and risk of prostate cancer: a population-based study. *Journal of the National Cancer Institute*, 94, 1648–1651.
- <http://botany.cz/en/allium-flavum/>, 25.05.2014
- http://jcautran.free.fr/archives_familiales/loisirs/fleurs_de_mon_jardin/allium_cepa.jpg, 25.05.2014
- <http://luirig.altervista.org/cpm/albums/leo-m1/leo-mic-Allium-sativum-1764.jpg>, 25.05.2014
- http://plant-hunters.blogspot.com/2013_09_01_archive.html, 25.05.2014
- <https://www.flickr.com/photos/falkperegrin/7814094978/>, 25.05.2014
- Hu, J., La Vecchia, C., Negri, E., Chatenoud, L., Bosetti, C., Jia, X., *et al.* (1999). Diet and brain cancer in adults: a case-control study in northeast China. *International Journal of Cancer*, 81, 20–23.
- Hughes, B., Lawson, L. (1991). Antimicrobial effects of *Allium sativum* L.(garlic), *Allium ampeloprasum* L.(elephant garlic), and *Allium cepa* L.(onion), garlic compounds and commercial garlic supplement products. *Phytotherapy Research*, 5, 154–158.
- Hughes, J., Tregova, A., Tomsett, A. B., Jones, M. G., Cosstick, R., Collin, H. A. (2005). Synthesis of the flavour precursor, alliin, in garlic tissue cultures. *Phytochemistry*, 66, 187–94.
- Ichikawa, M., Ide, N., Ono, K. (2006). Changes in organosulfur compounds in garlic cloves during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4849–4854.
- Ide, N., Lau, B. (2001). Garlic compounds minimize intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor- κ B activation. *The Journal of Nutrition*, 131, 1020S–1026S.
- Ide, N., Matsuura, H., Itakura, Y. (1996). Scavenging effect of aged garlic extract and its constituents on active oxygen species. *Phytotherapy Research*, 10, 340–341.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126, 1821–1835.
- Imai, K., Suga, K., Nakachi, K. (1997). Cancer-preventive effects of drinking green tea among a Japanese population. *Preventive Medicine*, 26, 769–775.
- Imai, S., Tsuge, N., Tomotake, M., Nagatome, Y., Sawada, H., Nagata, T., Kumagai, H. (2002). Plant biochemistry: an onion enzyme that makes the eyes water. *Nature*, 419, 685–685.
- Ip, C., Lisk, D. J., Thompson, H. J. (1996). Selenium-enriched garlic inhibits the early stage but not the late stage of mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 17, 1979–1982.
- Izzo, A.A., Capasso, R., Capasso, F. (2004). Eating garlic and onion: a matter of life or death. *British Journal of Cancer*, 91, 194.
- Järvenpää, E., Zhang, Z., Huopalahti, R., King, J. W. (1998). Determination of fresh onion (*Allium cepa* L.) volatiles by solid phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung A*, 207, 39–43.
- Jedelská, J. (2007). *Pharmaceutical value of onions (Allium L.) and related species of Central Asia*. Doctoral dissertation. Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg, Marburg, Nemačka.
- Jolliffe I.T. (2002). *Principal Component Analysis*, Series: Springer Series in Statistics, 2nd ed., Springer, NY, str. 1-6.
- Jones, M. G., Hughes, J., Tregova, A., Milne, J., Tomsett, A. B., Collin, H. A. (2004). Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic. *Journal of Experimental Botany*, 55, 1903–18.

- Jones, P. J., AbuMweis, S. S. (2009). Phytosterols as functional food ingredients: linkages to cardiovascular disease and cancer. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 12, 147–151.
- Jorgensen, J. H., Turnidge J. D. (2007). Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods, p. 1152–1172. U: Murray P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry M. L., Pfaller M. A. (ur.), Manual of clinical microbiology, 9th edition. ASM Press, Washington, USA.
- Kallio, H., Salorinne, L. (1990). Comparison of onion varieties by headspace gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1560–1564.
- Karakaya, S. (2004). Bioavailability of phenolic compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 453–64.
- Kaul, T. N., Middleton, E., Ogra, P. L. (1985). Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *Journal of Medical Virology*, 15, 71–79.
- Kaur C., Joshi, S., Kapoor, H. C. (2009). Antioxidants in onion (*Allium cepa* L.) cultivars grown in India. *Journal of Food Biochemistry*, 33, 184–200.
- Kawai, M., Hirano, T., Higa, S., Arimitsu, J., Maruta, M., Kuwahara, Y., et al. (2007). Flavonoids and related compounds as anti-allergic substances. *Allergology International*, 56, 113–23.
- Keepers, Y., Pizao, P., Peters, G., Ark-Otte, J., Winograd, B., Pinedo, H. (1991). Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. *European Journal of Cancer*, 27, 897–900.
- Kennedy, C., Church, D., Winston, G., Pryor, W. (1992). Tert-butyl hydroperoxide-induced radical production in rat liver mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine*, 12, 381–387.
- Kepp, O., Galluzzi, L., Lipinski, M., Yuan, J., Kroemer, G. (2011). Cell death assays for drug discovery. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 10, 221–37.
- Keusgen, M., 2002. Health and Alliums. U: Rabinowitch, H.D., Currah, L. (ur.), Advances in Allium Science. CABI Publishing, Wallingford, UK, str. 357–378.
- Keusgen, M., Schulz, H., Glodek, J., Krest, I., Krüger, H., Herchert, N., Keller, J. (2002). Characterization of some *Allium* hybrids by aroma precursors, aroma profiles, and alliinase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2884–2890.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A, Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18, 2328–75.
- Kim, J. (1997). Anti-bacterial action of onion (*Allium cepa* L.) extracts against oral pathogenic bacteria. *The Journal of Nihon University School of Dentistry*, 39, 136–141.
- Kim, M.-Y., Kim, Y.-C., Chung, S.-K. (2005). Identification and in vitro biological activities of flavonols in garlic leaf and shoot: inhibition of soybean lipoxygenase and hyaluronidase activities and scavenging of free radicals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 633–640.
- Kim, M.-Y., Kim, Y.-C., Chung, S.-K. (2005). Identification and in vitro biological activities of flavonols in garlic leaf and shoot: inhibition of soybean lipoxygenase and hyaluronidase activities and scavenging of free radicals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 633–640.
- Kim, S.Y., Park, K.W., Kim, J.Y., Jeong, I.Y., Byun, M.W., Park, J.E., et al. (2008). Thiosulfinates from *Allium tuberosum* L. induce apoptosis via caspase-dependent and - independent pathways in PC-3 human prostate cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18, 199–204.
- Kim, Y., Narayanan, S., Chang, K.-O. (2010). Inhibition of influenza virus replication by plant-derived isoquercetin. *Antiviral Research*, 88, 227–35.
- Kingston, D. G. I. (2011). Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. *Journal of Natural Products*, 74, 496–511.

- Klionsky, D. (2007). Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 931–937.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Järvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, *et al.* (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 560–8.
- Knezevic P., Kostanjsek R., Obreht D., Petrovic O. (2009). Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* specific bacteriophages with broad activity spectra. *Current Microbiology*, 59, 173–180.
- Knezevic, P., Obreht, D., Curcin, S., Petrusic, M., Aleksic, V., Kostanjsek, R., Petrovic, O. (2011). Phages of *Pseudomonas aeruginosa*: response to environmental factors and in vitro ability to inhibit bacterial growth and biofilm formation. *Journal of applied microbiology*, 111(1), 245–254.
- Knowles, L., Milner, J. (1998). Depressed p34 cdc2 kinase Activity and G2/M phase arrest induced by diallyl disulfide in HCT-15 cells. *Nutrition and Cancer*, 30, 169–174.
- Kohno, M. (2010). Applications of electron spin resonance spectrometry for reactive oxygen species and reactive nitrogen species research. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 47, 1–11.
- Koracevic, D., Koracevic, G. (2001). Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *Journal of Clinical Pathology*, 54, 356–361.
- Koshiro, Y., Jackson, M. C., Katahira, R., Wang, M.L., Nagai, C., Ashihara, H. (2007). Biosynthesis of chlorogenic acids in growing and ripening fruits of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* plants. *Zeitschrift für Naturforschung C, Journal of biosciences*, 62, 731–42.
- Kravets, S.D. Vollerner, Yu.S. Gorovits, M.B. Abubakirov, N.K. (1990). Steroids of the spirostan and furostan series from plants of the genus *Allium*. *Chemistry of Natural Compounds*, 26, 359–373.
- Krest, I., Glodek, J., Keusgen, M. (2000). Cysteine sulfoxides and alliinase activity of some *Allium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3753–60.
- Kris-Etherton, P. M., Lefevre, M., Beecher, G. R., Gross, M. D., Keen, C. L., Etherton, T. D. (2004). Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: the antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. *Annual Review of Nutrition*, 24, 511–38.
- Kris-Etherton, P. M., Lefevre, M., Beecher, G. R., Gross, M. D., Keen, C. L., Etherton, T. D. (2004). Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: the antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. *Annual Review of Nutrition*, 24, 511–38.
- Kroemer, G., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Peter, M. E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., *et al.* (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation*, 12, 1463–1467.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews*, 87, 99–163.
- Kumari, K., Mathew, B., Augusti, K. (1995). Antidiabetic and hypolipidemic effects of S-methyl cysteine sulfoxide isolated from *Allium cepa* Linn. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 32, 49–54.
- Kuranaga, E., Miura, M. (2007). Nonapoptotic functions of caspases: caspases as regulatory molecules for immunity and cell-fate determination. *Trends in Cell Biolgy*, 17, 135–144.
- Kurumbail, R., Stevens, A., Gierse, J., McDonald, J., Stegeman, R., Pak, J. *et al.* (1996). Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, 384, 644–648.
- Kusterer, J. (2010). *Neue Erkenntnisse der Schwefelchemie und Chemotaxonomie in Arten des Genus Allium*. Doktorska disertacija, Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg, Marburg, Nemačka.
- Kusterer, J., Fritsch, R. M., Keusgen, M. (2011). *Allium* species from Central and Southwest Asia are rich sources of marasmin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 8289–97.

- Kyo, E., Uda, N., Suzuki, A., Kakimoto, M., Ushijima, M., Kasuga, S., Itakura, Y. (1998). Immunomodulation and antitumor activities of aged garlic extract. *Phytomedicine*, 5, 259–267.
- Lachman, J., Pronek, D., Hejtmankova, A. (2003). Total polyphenol and main flavonoid antioxidants in different onion (*Allium cepa* L.) varieties. *Horticultural Science*, 30, 142–147.
- Lagarrigue, S., Chaumontet, C., Heberden, C., Martel, P., Gaillard-Sanchez, I. (1995). Suppression of oncogene-induced transformation by quercetin and retinoic acid in rat liver epithelial cells. *Cellular & Molecular Biology Research*, 41, 551–560.
- Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46, 244–82.
- Lamm, D., Riggs, D. (2001). Enhanced immunocompetence by garlic: role in bladder cancer and other malignancies. *The Journal of Nutrition*, 131, 1067S–1070S.
- Lancaster, J. E., Shaw, M. L., Joyce, M. D., McCallum, J. A., McManus, M. T. (2000). A novel alliinase from onion roots. Biochemical characterization and cDNA cloning. *Plant Physiology*, 122, 1269–79.
- Landolfi, R., Mower, R. L., Steiner, M. (1984). Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. *Biochemical Pharmacology*, 33, 1525–1530.
- Lanzotti, V. (2006). The analysis of onion and garlic. *Journal of chromatography A*, 1112, 3–22.
- Lapidot, T., Harel, S., Akiri, B., Granit, R., Kanner, J. (1999). PH-dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 67–70.
- Lau, B. H. S., Tadi, P. P., Tosk, J. M. (1990). *Allium sativum* (garlic) and cancer prevention. *Nutrition Research*, 10, 937–948.
- Lau, B. H., Yamasaki, T., Gridley, D. S. (1991). Garlic compounds modulate macrophage and T-lymphocyte functions. *Molecular Biotherapy*, 3(2), 103–107.
- Lautraite, S., Musonda, A., Doehmer, J. (2002). Flavonoids inhibit genetic toxicity produced by carcinogens in cells expressing CYP1A2 and CYP1A1. *Mutagenesis*, 17, 45–53.
- Lavrovsky, Y., Chatterjee, B., Clark, R. A., Roy, A. K. (2000). Role of redox-regulated transcription factors in inflammation, aging and age-related diseases. *Experimental Gerontology*, 35, 521–532.
- Law, M. R., Morris, J. K. (1998). By how much does fruit and vegetable consumption reduce the risk of ischaemic heart disease? *European Journal of Clinical Nutrition*, 52, 549–556.
- Lawson, L. (1998). Garlic: a review of its medicinal effects and indicated active compounds. U: Lawson, L.D., Bauer, R. (ur.), *Phytomedicines of Europe: chemistry and biological activity*. American Chemical Society, Washington, USA. str. 176–209.
- Lawson, L.D. (1996). The composition and chemistry of garlic cloves and processed garlic. U: Koch HP, Lawson LD (ur.) *Garlic: the science and therapeutic application of Allium sativum and related species*, Williams and Wilkins, Baltimore, USA, str. 37-108.
- Lawson, L.D., Gardner, C.D. (2005): Composition, stability, and bioavailability of garlic products used in a clinical trial. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 6254-6261.
- Lazarević, J. S., Đorđević, A. S., Zlatković, B. K., Radulović, N. S., Palić, R. M. (2011). Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Allium sphaerocephalon* L. subsp. *sphaerocephalon* (Liliaceae) inflorescences. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 322–9.
- Le Marchand, L., Murphy, S. P., Hankin, J. H., Wilkens, L. R., Kolonel, L. N. (2000). Intake of flavonoids and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 154–160.
- Lee, J. H., Kim, G. H. (2010). Evaluation of antioxidant and inhibitory activities for different subclasses flavonoids on enzymes for rheumatoid arthritis. *Journal of Food Science*, 75, H212-H217.

- Lee, J., Durst, R. W., Wrolstad, R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88, 1269–1278.
- Lee, J., Harnly, J. M. (2005). Free amino acid and cysteine sulfoxide composition of 11 garlic (*Allium sativum* L.) cultivars by gas chromatography with flame ionization and mass selective detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9100–9104.
- Lee, J.H., Yang, H.S., Park, K.W., Kim, J.Y., Lee, M.K., Jeong, I.Y. *et al.* (2009). Mechanisms of thiosulfinates from *Allium tuberosum* L.-induced apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *Toxicology Letters*, 188, 142–7.
- Lee, K. W., Lee, H. J. (2006). The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. *BioFactors*, 26, 105–121.
- Lee, S., Lee, J., Choi, S., Lee, J., Ohnisi-Kameyama, M., Kozukue, N., *et al.* (2008). Flavonoid content in fresh, home-processed, and light-exposed onions and in dehydrated commercial onion products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8541–8548.
- Lee, W., Shim, J., Zhu, B. (2005). Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids. *Molecular Pharmacology*, 68, 1018–1030.
- Lesjak, M. (2011). *Biopotencijal i hemijska karakterizacija ekstrakata i etarskih ulja vrsta roda Juniperus L.* Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija.
- Lesjak, M. M., Beara, I. N., Orčić, D. Z., Ristić, J. D., Anačkov, G. T., Božin, B. N., Mimica-Dukić, N. M. (2013). Chemical characterisation and biological effects of *Juniperus foetidissima* Willd. 1806. *LWT - Food Science and Technology*, 53, 530–539.
- Levine, B., Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132, 27–42.
- Li, M., Ciu, J., Ye, Y., Min, J., Zhang, L., Wang, K. *et al.* (2002). Antitumor activity of Z-ajoene, a natural compound purified from garlic: antimetabolic and microtubule-interaction properties. *Carcinogenesis*, 23, 573–579.
- Li, Q.-Q., Zhou, S.-D., He, X.-J., Yu, Y., Zhang, Y.-C., Wei, X.-Q. (2010). Phylogeny and biogeography of *Allium* (Amaryllidaceae: Alliaceae) based on nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast rps16 sequences, focusing on the inclusion of species endemic to China. *Annals of botany*, 106, 709–33.
- Lindahl, M., Tagesson, C. (1997). Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2. *Inflammation*, 21, 347–356.
- Liu, K. J., Shi, X. (2001). In vivo reduction of chromium (VI) and its related free radical generation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 222, 41–7.
- Liu, R. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 134, 3479S–3485S.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, S.L., Darnell, J. (2004). *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed. WH Freeman, New York, USA. str. 963.
- Long, L. H., Clement, M. V., Halliwell, B. (2000). Artifacts in cell culture: rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273, 50–3.
- Lowy, F. (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation*, 111, 1265–1273.
- Lun, Z., Burri, C., Menzinger, M., Kaminsky, R. (1994). Antiparasitic activity of diallyl trisulfide (Dasuansu) on human and animal pathogenic protozoa (*Trypanosoma* sp., *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*). *Annales de La Societe Belge de Medecine Tropicale*, 74, 51–59.

- Ly, T. N., Hazama, C., Shimoyamada, M., Ando, H., Kato, K., Yamauchi, R. (2005). Antioxidative compounds from the outer scales of onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8183–8189.
- Mahady, G. (2001). Allixin, a phytoalexin from garlic, inhibits the growth of *Helicobacter pylori* in vitro. *The American Journal of Gastroenterology*, 96, 3454–3455.
- Mahon, C.R., Manuselis G. (1995): *Enterobacteriaceae*. U: Mahon, C.R., Manuselis, G (ur.), Textbook of Diagnostic Microbiology. Saunders, Philadelphia, USA. str. 450-455.
- Makheja, A. N., Bailey, J. M. (1990). Antiplatelet constituents of garlic and onion. *Agents and Actions*, 29, 360–363.
- Marcocci, L., Maguire, J., Droy-Lefaix, M., Packer, L. (1994). The nitric oxide-scavenging properties of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 201, 748–755.
- Marin, P. (1996). Flavonoids as taxonomic markers in flowering plants. *Glasnik Instituta za botaniku i botaničke bašte Univerziteta u Beogradu*, 30, 19–37.
- Marin, P., Grayer, R., Kite, G., Matevski, V. (2003). External leaf flavonoids of *Thymus* species from Macedonia. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31, 1291–1307.
- Marinova, E.M., Yanishlieva, N.V. (2003): Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. *Food Chemistry*, 81, 189–197.
- Markham, K.R. (1982): *Techniques of flavonoid identification*. Academic Press, London, UK.
- Marks, F., Furstenberger, G. (1999). *Prostaglandins, leukotrienes, and other eicosanoids: from biogenesis to clinical application*. Wiley-VHC Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- Marnett, L. J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21, 361–70.
- Martínez, A., Urios, A., Blanco, M. (2000). Mutagenicity of 80 chemicals in *Escherichia coli* tester strains IC203, deficient in OxyR, and its oxyR(+) parent WP2 uvrA/pKM101: detection of 31 oxidative mutagens. *Mutation Research*, 467, 41–53.
- Martínez, A., Urios, A., Felipo, V., Blanco, M. (2001). Mutagenicity of nitric oxide-releasing compounds in *Escherichia coli*: effect of superoxide generation and evidence for two mutagenic mechanisms. *Mutation Research*, 497, 159–67.
- Masuzaki, S., Shigyo, M., Yamauchi, N. (2006a). Complete assignment of structural genes involved in flavonoid biosynthesis influencing bulb color to individual chromosomes of the shallot (*Allium cepa* L.). *Genes & Genetic Systems*, 81, 255–263.
- Masuzaki, S., Shigyo, M., Yamauchi, N. (2006b). Direct comparison between genomic constitution and flavonoid contents in *Allium* multiple alien addition lines reveals chromosomal locations of genes related to biosynthesis from dihydrokaempferol to quercetin glucosides in scaly leaf of shallot (*Allium cepa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 112, 607–617.
- Mathew, B. (1996): A review of *Allium* section *Allium*. Royal Botanic Garden, Kew, UK.
- Matsuura, H. (1997): Phytochemistry of garlic horticultural and processing procedures. U: Lanchance, P.P. (ur.) *Nutraceuticals: Designer Foods III: Garlic, Soy and Licorice*. Food and Nutrition Press, Trumbull, Connecticut, USA. str. 55-69.
- Matsuura, H. (2001). Saponins in garlic as modifiers of the risk of cardiovascular disease. *The Journal of Nutrition*, 131, 1000S–1005S.
- Mayeux, P. R., Agrawal, K. C., Tou, J. S., King, B. T., Lippton, H. L., Hyman, A L., et al. (1988). The pharmacological effects of allicin, a constituent of garlic oil. *Agents and Actions*, 25, 182–90.
- Meenakshi, V., Kapoor, S., Garg, S. L., Virman, N. (2009). *In vitro* antiviral activity of plant extracts against Infectious Bursal Disease Virus. *Journal of Immunology and Immunopathology*, 11, 48–52.

- Melino G. (2001): The Sirens' song. *Nature*, 412, 23-23.
- Mertens, A., Holvoet, P. (2001). Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *The FASEB Journal*, 15, 2073–2084.
- Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52, 673–751.
- Miean, K. H., Mohamed, S. (2001). Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3106–3112.
- Milner, J. A. (2001). Mechanisms by which garlic and allyl sulfur compounds suppress carcinogen bioactivation. Garlic and carcinogenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 492, 69–81.
- Mimica-Dukić, N., Simin, N., Svirčev, E., Orčić, D., Beara, I., Lesjak, M., Božin, B. (2012). The effect of plant secondary metabolites on lipid peroxidation and eicosanoid pathway. U: A. Catala (ur.), Lipid Peroxidation. InTech. Ljubljana, Slovenija. str. 193–210.
- Miranda, K. M., Espey, M. G., Wink, D. A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, 5, 62–71.
- Mohamed, E. F. (2010). Antiviral properties of garlic cloves juice compared with onion bulbs juice against potato virus Y (PVY). *Journal of American Science*, 6, 302–310.
- Mohammadi-Motlagh, H. R., Mostafaie, A., Mansouri, K. (2011). Anticancer and anti-inflammatory activities of shallot (*Allium ascalonicum*) extract. *Archives of Medical Science*, 7, 38–44.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55–63.
- Mühlbauer R.C., Li F. (1999): Effect of vegetables on bone metabolism. *Nature*, 401, 343-344.
- Mühlbauer, R. C., Lozano, A., Reinli, A. (2002). Onion and a mixture of vegetables, salads, and herbs affect bone resorption in the rat by a mechanism independent of their base excess. *Journal of bone and mineral research*, 17, 1230–1236.
- Munday, R., Munday, C. (1999). Low doses of diallyl disulfide, a compound derived from garlic, increase tissue activities of quinone reductase and glutathione transferase in the gastrointestinal tract of the rat. *Nutrition and Cancer*, 34, 42–48.
- Naczki, M., Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1523–1542.
- Nakagawa, H., Tsuta, K., Kiuchi, K., Senzaki, H., Tanaka, K., Hioki, K., Tsubura, A. (2001). Growth inhibitory effects of diallyl disulfide on human breast cancer cell lines. *Carcinogenesis*, 22, 891–897.
- Nappez, C., Battu, S., Beneytout, J. (1996). *trans,trans*-2,4-Decadienal: cytotoxicity and effect on glutathione level in human erythroleukemia (HEL) cells. *Cancer Letters*, 99, 115–119.
- Narajji, C., Karvekar, M., Das, A. (2007). Biological importance of organoselenium compounds. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69, 344–351.
- Nencini, C., Cavallo, F., Capasso, A., Franchi, G. G., Giorgio, G., Micheli, L. (2007). Evaluation of antioxidative properties of *Allium* species growing wild in Italy. *Phytotherapy Research*, 21, 874–878.
- Nie, D., Honn, K. (2002). Cyclooxygenase, lipoxygenase and tumor angiogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, 799–807.
- Nikolić, B., Mitić-Ćulafić, D., Vuković-Gačić, B., Knežević-Vukčević, J. (2012). Molecular mechanisms of action of antimutagens from sage (*Salvia officinalis*) and basil (*Ocimum basilicum*). U: Rajnikant M. (ur.), *Mutagenesis*. InTech. str. 86–112.
- Nikolova, M. T., Taskova, R. M., Peev, D. R. (2005). Exudate flavonoid aglycones of Veronica: Ecological and systematic implications. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33, 1258–1268.

- Nishimura, H., Higuchi, O., Tateshita, K. (2004). Antioxidative activity of sulfur-containing compounds in *Allium* species for human LDL oxidation in vitro. *BioFactors*, 21, 277–280.
- Nishimura, H., Takahashi, T., Wijaya, C., Satoh, A., Ariga, T. (2000). Thermochemical transformation of sulfur compounds in Japanese domestic *Allium*, *Allium victorialis* L. *BioFactors*, 13, 257–263.
- Nuutila, A., Puupponen-Pimiä, R., Aarni, M., Oksman-Caldentey, K.M. (2003). Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 81, 485–493.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267, 5421–5426.
- O'Donnell, G., Gibbons, S. (2007). Antibacterial activity of two canthin-6-one alkaloids from *Allium neapolitanum*, 657, 653–657.
- O'Gara, E. A., Hill, D. J., Maslin, D. J. (2000). Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2269–2673.
- Ohta, T., Tokishita, S., Tsunoi, R., Ohmae, S., Yamagata, H. (2002). Characterization of Trp(+) reversions in *Escherichia coli* strain WP2uvrA. *Mutagenesis*, 17, 313–316.
- Ohyama, M., Tanaka, T., Yokoyama, J., Iinuma, M. (1995). Occurrence of prenylated flavonoids and oligostilbenes and its significance for chemotaxonomy of genus *Sophora* (Leguminosae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 23, 669–677.
- Olea-Azar, C., Rigol, C., Mendizábal, F., Briones, R. (2006). Applications of electron spin resonance and spin trapping in tropical parasitic diseases. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 6, 211–20.
- Ong, T., Whong, W.-Z., Stewart, J. D., Brockman, H. E. (1989). Comparative antimutagenicity of 5 compounds against 5 mutagenic complex mixtures in *Salmonella typhimurium* strain TA98. *Mutation Research*, 222, 19–25.
- Oommen, S., Anto, R. J., Srinivas, G., Karunakaran, D. (2004). Allicin (from garlic) induces caspase-mediated apoptosis in cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, 485, 97–103.
- Orčić, D. (2010). Vrste tribusa Scandiceae (Apiaceae Lindley 1836, subfam. Apioideae) – potencijalni izvor biološki i farmakološki aktivnih sekundarnih biomolekula. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, Srbija.
- Orčić, D. Z., Mimica-Dukić, N. M., Francišković, M. M., Petrović, S. S., Jovin, E. D. (2011). Antioxidant activity relationship of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. *Chemistry central journal*, 5, 34–42.
- Orčić, D., Francišković, M., Bekvalac, K., Svirčev, E., Beara, I., Lesjak, M., Mimica-Dukić, N. (2014). Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection, *Food Chemistry*, 143:48–53.
- Orhan, D. D., Ozçelik, B., Ozgen, S., Ergun, F. (2010). Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological Research*, 165, 496–504.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4, 552–565.
- Ostling O., Johanson K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123, 291–298.
- Paolini, M., Pozzetti, L., Pedulli, G., Cipollone, M., Mesirca, R., Cantelli-Forti, G. (1996). Paramagnetic resonance in detecting carcinogenic risk from cytochrome P450 overexpression. *Journal of Investigative Medicine*, 44, 470–473.

- Park, E. H., Chang, H. H., Cha, Y. N. (1990). Induction of hepatic tumors with butylated hydroxyanisole in the self-fertilizing hermaphroditic fish *Rivulus ocellatus marmoratus*. *Japanese Journal of Cancer Research*, 81, 738–741.
- Park, E. Y., Ki, S. H., Ko, M. S., Kim, C. W., Lee, M. H., Lee, Y. S., Kim, S. G. (2005). Garlic oil and DDB, comprised in a pharmaceutical composition for the treatment of patients with viral hepatitis, prevents acute liver injuries potentiated by glutathione deficiency in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 155, 82–96.
- Park, J. B. (2011). Effects of typheramide and alfrutamide found in *Allium* species on cyclooxygenases and lipoxygenases. *Journal Of Medicinal Food*, 14, 226–231.
- Park, K.W., Kim, S. Y., Jeong, I. Y., Byun, M. W., Park, K. H., Yamada, K., Seo, K. I. (2007). Cytotoxic and antitumor activities of thiosulfonates from *Allium tuberosum* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7957–7961.
- Pârvu, A. E., Cătoi, A. F., Deelawar, S., Sarup, D., Pârvu, M. (2014). Anti-Inflammatory Effect of *Allium ursinum*. *Notulae Scientia Biologicae*, 6, 20–26.
- Pârvu, M., Pârvu, A. E., Vlase, L., Roșca-Casian, O., Pârvu, O. (2011). Antifungal properties of *Allium ursinum* L. ethanol extract. *Journal Of Medicinal Food*, 5, 2041–2046.
- Pârvu, M., Pârvu, A., Roșca-Casian, O., Vlase, L., Groza, G. (2009). Antifungal activity of *Allium obliquum*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 138–141.
- Pedersen, A., Johansen, C., Grønbaek, M. (2003). Relations between amount and type of alcohol and colon and rectal cancer in a Danish population based cohort study. *Gut*, 52, 861–7.
- Perchellet, J. P., Perchellet, E. M., Bellman, S. (1990). Inhibition of DMBA-induced mouse skin tumorigenesis by garlic oil and inhibition of two tumor-promotion stages by garlic and onion oil. *Nutrition and Cancer*, 14, 183–193.
- Pinheiro, P., Justino, G. (2012). Structural analysis of flavonoids and related compounds—a review of spectroscopic applications. U: V. Rao (ur.), *Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. Rijeka, Croatia: InTech. str. 33–56.
- Pinto, J. T., Qiao, C., Xing, J., Rivlin, R. S., Protomastro, M. L., Weissler, M. L., *et al.* (1997). Effects of garlic thioallyl derivatives on growth, glutathione concentration, and polyamine formation of human prostate carcinoma cells in culture. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 66, 398–405.
- Plants for a future (PFAF). (2013). Edible plants: an inspirational guide to choosing and growing unusual edible plants. Create Space Independent Publishing Platform. ISBN-10:1481170015.
- Plastaras, J. P., Riggins, J. N., Otteneder, M., Marnett, L. J. (2000). Reactivity and mutagenicity of endogenous DNA oxopropenylating agents: base propenals, malondialdehyde, and N-oxopropenyllysine. *Chemical Research in Toxicology*, 13, 1235–42.
- Porter, L., Hrstich, L., Chan, B. (1985). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, 25, 223–230.
- Prabhala, H., Pai, C., Prabhala, R. (2013). Anti-Inflammatory Natural Foods. U: R. Watson, V. Preedy (ur.), *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases*. Elsevier Inc., San Diego, USA. str. 279–303.
- Pratviel, G., Bernadou, J., Meunier, B. (1995). Carbon-hydrogen bonds of DNA sugar units as targets for chemical nucleases and drugs. *Angewandte Chemie*, 34, 746–769.
- Price, K. R., Rhodes, M. J. C. (1997). Analysis of the major flavonol glycosides present in four varieties of onion (*Allium cepa*) and changes in composition resulting from autolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74, 331–339.
- Price, M. L., Van Scoyoc, S., Butler, L. G. (1978). A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 1214–1218.

- Pyun, M.S., Shin, S. (2006). Antifungal effects of the volatile oils from *Allium* plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole. *Phytomedicine*, 13, 394–400.
- Radojević, I. D., Stanković, M. S., Stefanović, O. D., Topuzović, M. D., Čomić, L. R., Ostojić, A. M. (2011). Anti-Aspergillus properties of different extracts from selected plants. *African Journal of Microbiology Research*, 5, 3986–3990.
- Rahman, A., Hadi, S., Parish, J., Ainley, K. (1989). Strand scission in DNA induced by quercetin and Cu (II): role of Cu (I) and oxygen free radicals. *Carcinogenesis*, 10, 1833–1810.
- Randle, W., Bussard, M. (1993). Pungency and sugars of short-day onions as affected by sulfur nutrition. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118, 766–770.
- Rao, C., Rivenson, A., Simi, B., Reddy, B. (1995). Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound. *Cancer Research*, 55, 259–266.
- Raso, G. M., Meli, R., Di Carlo, G., Pacilio, M., Di Carlo, R. (2001). Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sciences*, 68, 921–931.
- Raza, A., Preisler, H. D., Mayers, G. L., Bankert, R (1984). Rapid enumeration of S-phase cells by means of monoclonal antibodies. *N. Engl. J. Med.* 370. 991.
- Raza, A., Spiridonidis, C., Ucar, K., Mayers, G., Bankert, R., Preisler, H. D. (1985). Double labeling of S-phase murine cells with bromodeoxyuridine and a second DNA-specific probe second DMA-specific probe. *Cancer research*, 45, 2283–2287.
- Reddy, B., Rao, C., Rivenson, A., Kelloff, G. (1993). Chemoprevention of colon carcinogenesis by organosulfur compounds. *Cancer Research*, 53, 3493–3498.
- Reddy, B., Wang, C., Samaha, H., Lubet, R. (1997). Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary perillyl alcohol. *Cancer Research*, 57, 420–425.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., Zhang, L. (2003). Flavonoids: promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews*, 23, 519–534.
- Reindu, F., Brohard-Bohn, B., Pain, S., Bachelot-Loza, C., Auger, J. (2001). Thiosulfates inhibit platelet aggregation and microparticle shedding at a calpain-dependent step. *Thrombosis and Haemostasis*, 86, 1284–1291.
- Rezgui, A., Mitaine-Offer, A.-C., Paululat, T., Delemasure, S., Dutartre, P., Lacaille-Dubois, M.-A. (2014). Cytotoxic steroidal glycosides from *Allium flavum*. *Fitoterapia*, 93, 121–125.
- Rezgui, A., Mitaine-Offer, A.-C., Paululat, T., Delemasure, S., Dutartre, P., Lacaille-Dubois, M.-A. (2014). Cytotoxic steroidal glycosides from *Allium flavum*. *Fitoterapia*, 93, 121–125.
- Riboli, E., Norat, T. (2003). Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 559S–569S.
- Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933–956.
- Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 152–159.
- Robert, V., Mouillé, B., Mayeur, C., Michaud, M., Blachier, F. (2001). The garlic compound diallyl-disulfide on the metabolism, adherence and cell cycle of HT-29 colon carcinoma cells: evidence of sensitive and resistant sub-populations. *Carcinogenesis*, 22, 1155–1161.
- Rong, Y., Yang, E., Zhang, K., Mack, P. (2000). Quercetin-induced apoptosis in the monoblastoid cell line U937 in vitro and the regulation of heat shock proteins expression. *Anticancer Research*, 20, 4339–4345.

- Ross, Z., O'Gara, E., Hill, D. J., Sleightholme, H. V., Maslin, D. J. (2001). Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 475–480.
- Ruddock, P., Liao, M., Foster, B., Lawson, L., Arnason, J. T., Dillon, R. J. (2005). Garlic natural health products exhibit variable constituent levels and antimicrobial activity against *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. *Phytotherapy Research*, 19, 327–334.
- Runkova, L., Talieva, M. (1970). Chlorogenic acid in species of the genus *Allium*. *Physiology and Biochemistry of Cultivated Plants*, 2, 544–547.
- Sabha, D. (2011). Pharmaceutical and chemical analysis of the components carrying the antiplatelet activity of extracts from *Allium ursinum* and *Allium sativum*. Doktorska disertacija. Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig, Leipzig.
- Sadeghi, M., Zolfaghari, B., Senatore, M., Lanzotti, V. (2013). Antifungal cinnamic acid derivatives from Persian leek (*Allium ampeloprasum* subsp. *persicum*). *Phytochemistry Letters*, 6, 360–363.
- Sakakibara, H., Yoshino, S., Kawai, Y., Terao, J. (2008). Antidepressant-like effect of onion (*Allium cepa* L.) powder in a rat behavioral model of depression. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72, 94–100.
- Sakamoto, K. (2000). Synergistic effects of thearubigin and genistein on human prostate tumor cell (PC-3) growth via cell cycle arrest. *Cancer Letters*, 151, 103–109.
- Sakamoto, K., Lavvson, L., Milner, J. (1997). Allyl sulfides from garlic suppress the in vitro proliferation of human A549 lung tumor cells. *Nutrition and Cancer*, 29, 152–156.
- Salvemini, D., Seibert, K., Masferrer, J., Misko, T., Currie, M., Needleman, P. (1994). Endogenous nitric oxide enhances prostaglandin production in a model of renal inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, 93, 1940–1947.
- Samaha, H., Kelloff, G., Steele, V., Rao, C., Reddy, B. (1997). Modulation of apoptosis by sulindac, curcumin, phenylethyl-3-methylcaffeate, and 6-phenylhexyl isothiocyanate: apoptotic index as a biomarker in colon cancer chemoprevention and promotion. *Cancer Research*, 57, 1301–1305.
- Sambrook, J., Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Sanchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8, 121–137.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270–276.
- Santas, J., Almajano, M. P., Carbó, R. (2010). Antimicrobial and antioxidant activity of crude onion (*Allium cepa*, L.) extracts. *International Journal of Food Science & Technology*, 45, 403–409.
- Saravanan, G., Prakash, J. (2004). Effect of garlic (*Allium sativum*) on lipid peroxidation in experimental myocardial infarction in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 94, 155–158.
- Savić, A. (2013). Primena naprednih statističkih metoda u analizi složenih EPR i fluorescentnih spektara slobodnih radikala. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija.
- Scaffidi, P., Misteli, T., Bianchi, M. E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, 418, 191–195.
- Schmitt, B., Schulz, H., Storsberg, J., Keusgen, M. (2005). Chemical characterization of *Allium ursinum* L. depending on harvesting time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7288–7294.
- Schneider I., Bucar F. (2005). Lipoxygenase inhibitors from natural plant sources. Part 2: Medicinal plants with inhibitory activity on arachidonate 12-lipoxygenase, 15-lipoxygenase and leukotriene receptor antagonists. *Phytotherapy Research*, 19, 263–272.

- Schulze-Osthoff, K. (2008). How cells die: Apoptosis and other cell death pathways. U: H.-J. Rode (ur.), Apoptosis, cytotoxicity and cell proliferation, 4th edition. Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany. str. 2–16.
- Schwerk C, Schulze-Osthoff K. (2003). Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. *Biochemical Pharmacology*, 66, 1453-1458.
- Schwimmer, S., Weston, W.J. (1961). Onion flavor and odor, enzymatic development of pyruvic acid in onion as a measure of pungency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 9, 301-304.
- Seki, T., Tsuji, K., Hayato, Y., Moritomo, T., Ariga, T. (2000). Garlic and onion oils inhibit proliferation and induce differentiation of HL-60 cells. *Cancer Letters*, 160, 29–35.
- Selway J.W.T. (1986). Antiviral activity of flavones and flavans. U: Cody V, Middleton E, Harborne JB (ur.). Plant flavonoids in biology and medicine: Biochemical, pharmacological and structure activity relationships. Alan R Liss Inc, New York. str. 521–536.
- Semmler, F. W. (1892). Über das ätherische Öl des Knoblauchs (*Allium sativum*). *Archiv der Pharmazie*, 230, 434–443.
- Shah, M., Kannamkumarath, S. S., Wuilloud, J. C. A., Wuilloud, R. G., Caruso, J. A. (2004). Identification and characterization of selenium species in enriched green onion (*Allium fistulosum*) by HPLC-ICP-MS and ESI-ITMS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19, 381–386.
- Shahidi, F., Wanasundara, P. K. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 67–103.
- Shams-Ghahfarokhi, M., Shokoohamiri, M.-R., Amirrajab, N., Moghadasi, B., Ghajari, A., Zeini, F., et al. (2006). *In vitro* antifungal activities of *Allium cepa*, *Allium sativum* and ketoconazole against some pathogenic yeasts and dermatophytes. *Fitoterapia*, 77, 321–323.
- Shin, S.-C., Choi, J.-S., Li, X. (2006). Enhanced bioavailability of tamoxifen after oral administration of tamoxifen with quercetin in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 313, 144–149.
- Sholto-Douglas. J. (1978). Alternative foods: A world guide to lesser-known edible plants. Transatlantic Arts, Levittown, New York, USA. ISBN-10: 0720709008
- Siegers, C. P., Steffen, B., Röbbke, A., Pentz, R. (1999). The effects of garlic preparations against human tumor cell proliferation. *Phytomedicine*, 6, 7–11.
- Sies, H., Menck, C. (1992). Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutation Research*, 275, 367–375.
- Sigounas, G., Hooker, J., Li, W., Anagnostou, A., Steiner, M. (1997). S-Allylmercaptocysteine, a stable thioallyl compound, induces apoptosis in erythroleukemia cell lines. *Nutrition and Cancer*, 28, 153–159.
- Simic, M. G., Bergtold, D. S., Karam, L. R. (1989). Generation of oxy radicals in biosystems. *Mutation research*, 214, 3–12.
- Simin, N. (2008). Biohemijska ispitivanja antioksidantnih aktivnosti u odabranim vrstama roda *Equisetum* L. Magistrska teza, Prirodno-matematički fakultet Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija.
- Simin, N., Orcic, D., Cetojevic-Simin, D., Mimica-Dukic, N., Anackov, G., Beara, I., et al. (2013). Phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities of small yellow onion (*Allium flavum* L. subsp. *flavum*, Alliaceae). *LWT - Food Science and Technology*, 54, 139–146.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175(1), 184-191.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152–178.

- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., et al. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82, 1107–12.
- Slimestad, R., Fossen, T., Vågen, I. M. (2007). Onions: a source of unique dietary flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10067–10080.
- Smith, W. L. (1989). The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochemical Journal*, 259, 315–324.
- Smoczkiwicz, M. A., Nitschke, D., Wielądek, H. (1982). Microdetermination of steroid and triterpene saponin glycosides in various plant materials I. *Allium* species. *Mikrochimica Acta*, 78, 43–53.
- Solecka, D. (1997). Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factors. *Acta Physiologiae Plantarum*, 19, 257–268.
- Srivastava, K. (1984). Effects of aqueous extracts of onion, garlic and ginger on platelet aggregation and metabolism of arachidonic acid in the blood vascular system: *in vitro* study. *Prostaglandins, Leukotrienes and Medicine*, 13, 227–235.
- Srivastava, K. (1986). Onion exerts antiaggregatory effects by altering arachidonic acid metabolism in platelets. *Prostaglandins, Leukotrienes and Medicine*, 24, 43–50.
- Srivastava, K., Justesen, U. (1989). Isolation and effects of some garlic components on platelet aggregation and metabolism of arachidonic acid in human blood platelets. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 101(8), 292–299.
- Srivastava, K., Tyagi, O. (1993). Effects of a garlic-derived principle (ajoene) on aggregation and arachidonic acid metabolism in human blood platelets. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 49, 587–595.
- Stajner, D., Igić, R., Popović, B., Malencic, D. (2008). Comparative study of antioxidant properties of wild growing and cultivated *Allium* species. *Phytotherapy Research*, 22, 113–117.
- Stajner, D., Popovic, B. M. (2009). Comparative study of antioxidant capacity in organs of different *Allium* species. *Central European Journal of Biology*, 4, 224–228.
- Stavrovskaya, I. G., Narayanan, M. V., Zhang, W., Krasnikov, B. F., Heemskerk, J., Young, S. S., et al. (2004). Clinically approved heterocyclics act on a mitochondrial target and reduce stroke-induced pathology. *The Journal of Experimental Medicine*, 200, 211–22.
- Stearn, W. T. (1978). European species of *Allium* and allied genera of Alliaceae: a synonymic enumeration. *Annales Musei Goulandris*, 4, 83–198.
- Stearn, W.T. (1980). *Allium* L. U: Tutin, T. G., Heywood, V. H. Burges, N. A. Moore, D. M. Valentine, D. H. Walters, S. M. Webb D. A. (ur.), *Flora Europaea* V. Cambridge University Press, Cambridge, UK. str. 49-69.
- Steiner, C., Peters, W. H. M., Gallagher, E. P., Magee, P., Rowland, I., Pool-Zobel, B. L. (2007). Genistein protects human mammary epithelial cells from benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide and 4-hydroxy-2-nonenal genotoxicity by modulating the glutathione/glutathione S-transferase system. *Carcinogenesis*, 28, 738–48.
- Steinmetz, K., Potter, J. (1996). Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *Journal of the American Dietetic Association*, 96, 1027–1039.
- Stoll, A., Seebeck, E. (1947). Über alliin, die genuine Muttersubstanz des Knoblauchols. *Experientia*, 3, 114–115.
- Sun, X. B., Tian, W. X. (2009). Inhibitory Effects of *Allium* Vegetable Extracts on Fatty Acid Synthase. *Food Science and Technology Research*, 15, 343–346.

- Sundaram, S., Milner, J. (1993). Impact of organosulfur compounds in garlic on canine mammary tumor cells in culture. *Cancer Letters*, 74, 85–90.
- Sundaram, S., Milner, J. (1996a). Diallyl disulfide induces apoptosis of human colon tumor cells. *Carcinogenesis*, 17, 669–673.
- Sundaram, S., Milner, J. (1996b). Diallyl disulfide suppresses the growth of human colon tumor cell xenografts in athymic nude mice. *The Journal of Nutrition*, 126, 1355–1361.
- Sussenguth, K. (1939). *Allium* L. U: Hegi, G. (ur). *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*. Vol. 2. Carl Hanser Verlag, München, Germany, str.268-294.
- Takahashi, S., Hakoi, K., Yada, H., Hirose, M., Ito, N., Fukushima, S. (1992). Enhancing effects of diallyl sulfide on hepatocarcinogenesis and inhibitory actions of the related diallyl disulfide on colon and renal carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*, 13, 1513–1518.
- Takasaki, J., Kawauchi, Y., Masuho, Y. (1998). Synergistic Effect of Type II Phospholipase A2 and Platelet-activating factor on Mac-1 surface expression and exocytosis of gelatinase granules in human neutrophils: evidence for the 5-lipoxygenase-dependent mechanism. *The Journal of Immunology*, 160, 5066–5072.
- Takenaka, M., Nanayama, K., Ohnuki, I., Udagawa, M., Sanada, E., Isobe, S. (2004). Cooking loss of major onion antioxidants and the comparison of onion soups prepared in different ways. *Food Science and Technology Research*, 10, 405–409.
- Takeyama, H., Hoon, D., Saxton, R., Morton, D., Irie, R. (1993). Growth inhibition and modulation of cell markers of melanoma by S-allyl cysteine. *Oncology*, 50, 63–69.
- Takhtajan, A. (1997). *Diversity and Classification of Flowering Plants*. Columbia University Press, New York
- Tapiero, H., Townsend, D. M., Tew, K. D. (2004). Organosulfur compounds from alliaceae in the prevention of human pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58, 183–193.
- Taraphdar, A., Roy, M., Bhattacharya, R. (2001). Natural products as inducers of apoptosis: Implication for cancer therapy and prevention. *Current Science*, 80, 1387–1396.
- Tatarintsev, A., Vrzhets, P., Ershov, D., Shchegolev, A., Turgiev, A., Karamov, E., *et al.* (1992). The ajoene blockade of integrin-dependent processes in an HIV-infected cell system. *Vestn Ross Akad Med Nauk*, 11-12, 6–10.
- Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H., Sokmen, A. (2005). In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of five species from Turkey. *Food Chemistry*, 92, 89–92.
- Thomson, M., Ali, M. (2003). Garlic (*Allium sativum*): A review of its potential use as an anti-cancer agent. *Current Cancer Drug Targets*, 3, 67–81.
- Thomson, M., Al-Qattan, K., Bordia, T., Ali, M. (2006). Including garlic in the diet may help lower blood glucose, cholesterol, and triglycerides. *The Journal of Nutrition*, 136, 800S–802S.
- Torskangerpoll, K., Andersen, Ø. M. (2005). Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values. *Food Chemistry*, 89, 427–444.
- Tsai, Y., Cole, L., Davis, L., Lockwood, S., Simmons, V., Wild, G. (1985). Antiviral properties of garlic: in vitro effects on influenza B, herpes simplex and coxsackie viruses. *Planta Medica*, 5, 460–461.
- Tuan, P. A., Park, N. Il, Li, X., Xu, H., Kim, H. H., Park, S. U. (2010). Molecular cloning and characterization of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase in the phenylpropanoid biosynthesis pathway in garlic (*Allium sativum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10911–10917.
- Tzanoudakis, D., Kyriotakis, Z. (1993). *Allium platakisii*, a new species of the Greek insular flora. *Flora Mediterranea*, 3, 309–314.

- Uddin, S., Choudhry, M. (1995). Quercetin, a bioflavonoid, inhibits the DNA synthesis of human leukemia cells. *Biochemistry & Molecular Biology International*, 36, 545–550.
- Urios, A., Blanco, M. (1996). Specificity of spontaneous and t-butyl hydroperoxide-induced mutations in delta oxyR strains of Escherichia coli differing with respect to the SOS mutagenesis proficiency and to the MutY and MutM functions. *Mutation Research*, 354, 95–101.
- Urios, A., Herrera, G., Blanco, M. (1995). Detection of oxidative mutagens in strains of Escherichia coli deficient in the OxyR or MutY functions: dependence on SOS mutagenesis. *Mutation Research*, 332, 9–15.
- Valverde M., Fortoul TI., Diaz-Barriga F., Mejia J., del Castillo ER. (2000). Induction of genotoxicity by cadmium chloride inhalation in several organs of CD-1 mice. *Mutagenesis*, 15, 109–114.
- Van Damme, E. J., Smeets, K., Torrekens, S., Van Leuven, F., Peumans, W. J. (1992). Isolation and characterization of alliinase cDNA clones from garlic (*Allium sativum* L.) and related species. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 209, 751–7.
- Vitrac, X., Castagnino, C., Waffo-Téguo, P., Delaunay, J. C., Vercauteren, J., Monti, J. P., et al. (2001). Polyphenols newly extracted in red wine from southwestern France by centrifugal partition chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5934–5938.
- Vlase, L., Parvu, M., Parvu, E. A., Toiu, A. (2012). Chemical constituents of three *Allium* species from Romania. *Molecules*, 18, 114–27.
- Von Hundelshausen, P., Weber, C. (2007). Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circulation Research*, 100, 27–40.
- Votto, A., Domingues, B., Souza, M. De. (2010). Toxicity mechanisms of onion (*Allium cepa*) extracts and compounds in multidrug resistant erythroleukemic cell line. *Biological Research*, 43, 429–437.
- Wadsworth, T. L., Koop, D. R. (1999). Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. *Biochemical Pharmacology*, 57, 941–949.
- Wall, M. M., Corgan, J. N. (1992). Relationship between pyruvate analysis and flavor perception for onion pungency determination. *Hortscience*, 27, 1029–1030.
- Wall, M., Wani, M., Hughes, T., Taylor, H. (1988). Plant antimutagenic agents, 1. General bioassay and isolation procedures. *Journal of Natural Products*, 51, 866–873.
- Wang, D., DuBois, R. N. (2012). Associations between obesity and cancer: the role of fatty acid synthase. *Journal of the National Cancer Institute*, 104, 343–345.
- Wang, Y., Tian, W. X., Ma, X. F. (2012). Inhibitory effects of onion (*Allium cepa* L.) extract on proliferation of cancer cells and adipocytes via inhibiting fatty acid synthase. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 13, 5573–5579.
- WCSP (2013): World Checklist of Selected Plant Families. Royal Botanic Gardens, Kew. el. verzija. (<http://apps.kew.org/wcsp/>)
- Weber, N. D., Andersen, D. O., North, J. A., Murray, B. K., Lawson, L. D., Hughes, B. G. (1992). *In vitro* virucidal effects of *Allium sativum* (garlic) extract and compounds. *Planta Medica*, 58, 417–423.
- Weisberger, A., Pensky, J. (1958). Tumor inhibition by a sulfhydryl-blocking agent related to an active principle of garlic (*Allium sativum*). *Cancer Research*, 18, 1301–1308.
- Welch, C., Wuarin, L., Sidell, N. (1992). Antiproliferative effect of the garlic compound S-allyl cysteine on human neuroblastoma cells in vitro. *Cancer Letters*, 63, 211–219.
- Wertheim, T. (1844). Untersuchung des Knoblauchöls. *Annalen der Chemie und Pharmacie*, 51, 289–315.

- Wetli, H. A., Brenneisen, R., Tschudi, I., Langos, M., Bigler, P., Sprang, T., Schürch, S., *et al.* (2005). A gamma-glutamyl peptide isolated from onion (*Allium cepa* L.) by bioassay-guided fractionation inhibits resorption activity of osteoclasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3408–3414.
- Whanger, P. D. (2004). Selenium and its relationship to cancer: an update. *British Journal of Nutrition*, 91, 11–28.
- Whitaker, J. (1976). Development of flavor, odor, and pungency in onion and garlic. *Advances in Food Research*, 22, 73–133.
- WHO Monographs on selected medicinal plants – Vol. 1 (1999). World Health Organization, Geneva. str. 5–32.
- Wilde-Duyfjes, B. (1973). Typification of 23 *Allium* species described by Linnaeus and possibly occurring in Africa. *TAXON*, 22, 57–91.
- Wilson, E. A., Demmig-Adams, B. (2007). Antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial properties of garlic and onions. *Nutrition & Food Science*, 37, 178–183.
- Witte, J. S., Longnecker, M. P., Bird, C. L., Lee, E. R., Frankl, H. D., Haile, R. W. (1996). Relation of vegetable, fruit, and grain consumption to colorectal adenomatous polyps. *American Journal of Epidemiology*, 144, 1015–1025.
- Wong, Y. C. B., Wang, W. P., Cho, C. H., Fan, X. M., Lin, M. C. M., Kung, H. F., Lam, S. K. (2001). 12-Lipoxygenase inhibition induced apoptosis in human gastric cancer cells is essential for tumour cell proliferation. *Lipoxygenases*, 22, 1349–1354.
- Woyengo, T. A., Ramprasath, V. R., Jones, P. J. H. (2009). Anticancer effects of phytosterols. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63, 813–20.
- Wu, P. P., Chung, H. W., Liu, K. C., Wu, R. S.C., Yang, J. S., Tang, N. Y. *et al.* (2011). Diallyl sulfide induces cell cycle arrest and apoptosis in HeLa human cervical cancer cells through the p53, caspase- and mitochondria-dependent pathways. *International Journal of Oncology*, 38, 1605–1613.
- Wyatt, R., Hunt, D.M. (1991): Hybridization in North American *Asclepias*. II. Flavonoid evidence. *Systematic Botany*, 16, 132–142.
- Wyllie, A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284, 555–556.
- Xiao, D., Choi, S., Johnson, D. E., Vogel, V. G., Johnson, C. S., Trump, D. L., *et al.* (2004). Diallyl trisulfide-induced apoptosis in human prostate cancer cells involves c-Jun N-terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase-mediated phosphorylation of Bcl-2. *Oncogene*, 23, 5594–606.
- Xu, X.Y., Song, G. Q., Yu, Y. Q., Ma, H. Y., Ma, L., Jin, Y. N. (2013). Apoptosis and G2/M arrest induced by *Allium ursinum* (ramson) watery extract in an AGS gastric cancer cell line. *Oncotargets and Therapy*, 6, 779–83.
- Yamada, Y., Azuma, K. (1977). Evaluation of the in vitro antifungal activity of allicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 11, 743–749.
- Yamasaki, T., Teel, R., Lau, B. (1991). Effect of allixin, a phytoalexin produced by garlic, on mutagenesis, DNA-binding and metabolism of aflatoxin B1. *Cancer Letters*, 59, 89–94.
- Yang, C., Chhabra, S., Hong, J., Smith, T. (2001). Mechanisms of inhibition of chemical toxicity and carcinogenesis by diallyl sulfide (DAS) and related compounds from garlic. *The Journal of Nutrition*, 131, 1041S–1045S.
- Yang, J., Meyers, K. J., van der Heide, J., Liu, R. H. (2004). Varietal differences in phenolic content and antioxidant and antiproliferative activities of onions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6787–6793.

- Yang, L., Mashima, T., Sato, S., Mochizuki, M., Sakamoto, H., Yamori, T., et al. (2003). Suppression of apoptosome by inhibitor of apoptosis protein in non-small cell lung cancer H460 cells therapeutic effect of a novel polyarginine-conjugated Smac peptide. *Cancer Research*, 63, 831–837.
- Yin, M. C., Tsao, S. M. (1999). Inhibitory effect of seven *Allium* plants upon three *Aspergillus* species. *International Journal of Food Microbiology*, 49, 49–56.
- Yin, M., Hwang, S., Chan, K. (2002). Nonenzymatic antioxidant activity of four organosulfur compounds derived from garlic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6143–6147.
- Yoshida, M., Sakai, T., Hosokawa, N., Marui, N., Matsumoto, K., Fujioka, A., et al. (1990). The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. *FEBS Letters*, 260, 10–13.
- You, W. C., Zhang, L., Gail, M. H., Ma, J. L., Chang, Y. S., Blot, W. J., et al. (1998). *Helicobacter pylori* infection, garlic intake and precancerous lesions in a Chinese population at low risk of gastric cancer. *International Journal of Epidemiology*, 27, 941–944.
- Zaporozhets, O. A., Krushynska, O. A., Lipkovska, N. A., Barvinchenko, V. N. (2004). A new test method for the evaluation of total antioxidant activity of herbal products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 21–5.
- Zhang, H., Du, G., Zhang, J. (2004). Assay of mitochondrial functions by resazurin *in vitro*. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25, 385–389.
- Zhu, J.W., Chen, T., Guan, J., Liu, W.B., Liu, J. (2012). Neuroprotective effects of allicin on spinal cord ischemia-reperfusion injury via improvement of mitochondrial function in rabbits. *Neurochemistry international*, 61, 640–8.
- Zoratti, M., Szabò, I., De Marchi, U. (2005). Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1706, 40–52.

8. Prilog

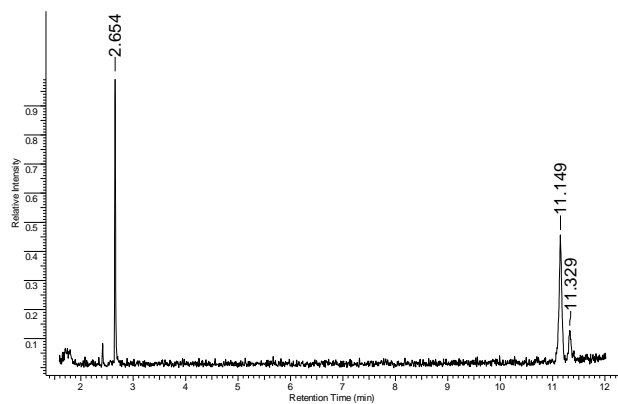
8.1 PODACI O UZORCIMA BILJNOG MATERIJALA

Tabela 8.1. Oznake vaučera deponovanog biljnog materijala koršćenog za analize, vreme sakupljanja i lokaliteti

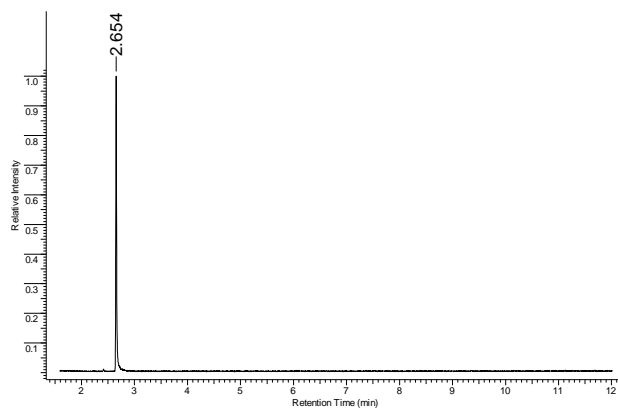
Biljna vrsta	Vreme sakupljanja	Lokalitet	Oznaka vaučera
<i>Allium paniculatum</i> subsp. <i>marginatum</i>	Jul 2009	Titelski Breg	2-2050
<i>Allium flavum</i> L. 1753 subsp. <i>flavum</i> var. <i>flavum</i>	Jul 2009	Vršački breg, Malo Središte	2-1769
	Jul 2009	Mokra Gora, Šargan	2-1768
	Jul 2009	Dimitrovgrad, Klisura Jerme	2-1766
	Jul 2009	Dimitrovgrad	2-1765
	Jul 2009	Pirot, Babušnica	2-1767
	Jul 2009	Bela Palanka	2-1764
	Jul 2012	Tara	2-1768
<i>Allium carinatum</i> subsp. <i>pulchellum</i> var. <i>pulchellum</i>	Jul 2009	Rtanj, visoravan	2-1628
	Jul 2009	Tara, Kremna	2-1771
<i>Allium carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i> var. <i>carinatum</i>	Jul 2009	Vlasinsko jezero, Brana	2-1770
	Jul 2009	Tara, Kaluđerske bare	2-1772
	Jul 2009	Čemernik	2-1773
	Jul 2010	Klisura Dervente	2-1627
	Jul 2010	Kaluđerske bare	2-1626
<i>Allium pallens</i> subsp. <i>tenuiflorum</i>	Jul 2012	Ratnj	2-1625
	Jul 2009	Beli Rzav	2-1778
<i>Allium fuscum</i> var. <i>gracile</i>	Jul 2010	Beli Rzav	2-1779
	Jul 2009	Tara, Vidikovac	2-1774
<i>Allium fuscum</i> var. <i>fuscum</i>	Jul 2009	Beli Rzav	2-1777
	Jul 2010	Zaovine	2-1776
	Jul 2010	Klisura Dervente	2-1775
	Jul 2012	Rtanj	2-1624
<i>Allium rhodopeum</i>	Jul 2009	Dimitrovgrad, Deponija	2-1780
<i>Allium melanantherum</i>	Jul 2009	Plana, šuma breze	2-1801
	Jul 2009	Plana, livada	2-1802
	Jul 2009	Čemernik	2-1800
<i>Allium oleraceum</i>	Jul 2010	Kosmovac kod Niša	2-1781
	Jul 2012	Rtanj	2-1623
<i>Allium cepa</i> (crni), gajeni	Jul 2010	Fruška Gora, Neradin	2-1762
<i>Allium sativum</i> , gajeni	Jul 2010	Šajkaš	2-1622

8.2 HEADSPACE GC-MS ANALIZA

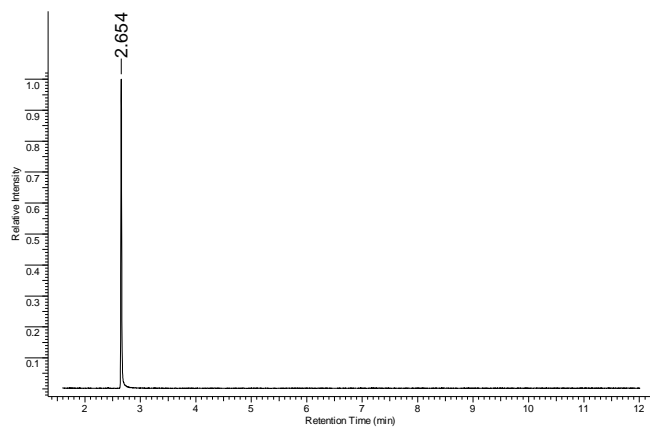
A. flavum subsp. *flavum*, Vršački breg



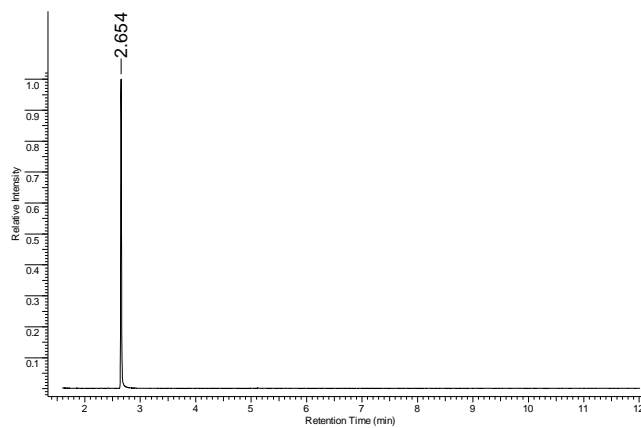
A. flavum subsp. *flavum*, Babušnička reka



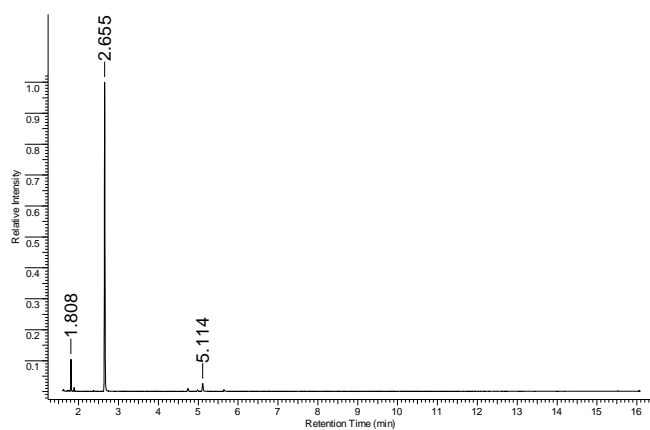
A. flavum subsp. *flavum*, Mokra Gora



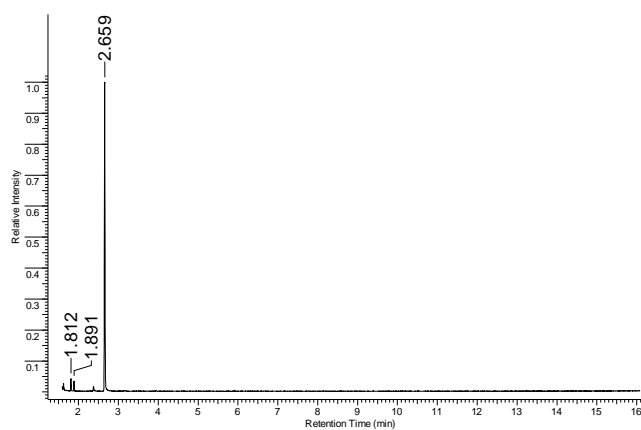
A. flavum subsp. *flavum*, Klisura Jerme



A. flavum subsp. *flavum*, Klisura Dervente

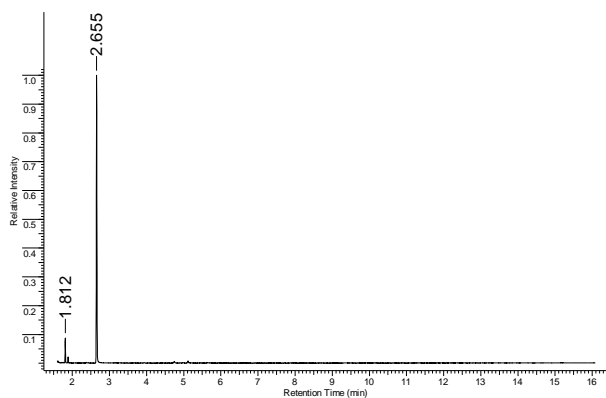


A. flavum subsp. *flavum*, Titelski breg

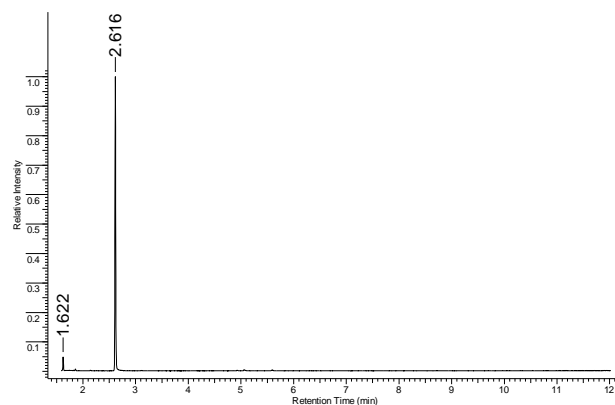


Slika 8.1. Headspace GC-MS hromatogrami uzoraka vrste *A. flavum* sa različitih lokaliteta

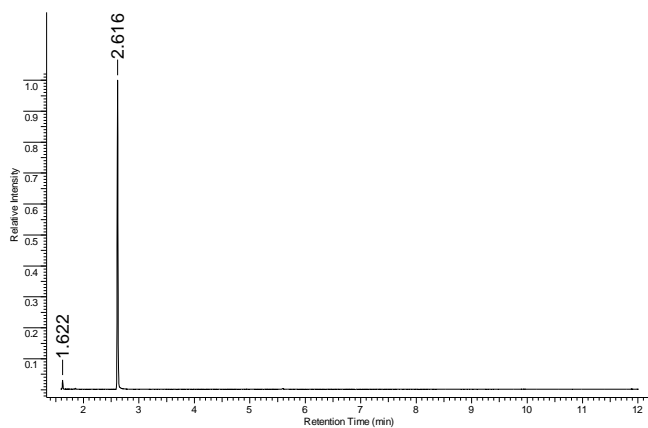
A. flavum subsp. *flavum*, Zaovine



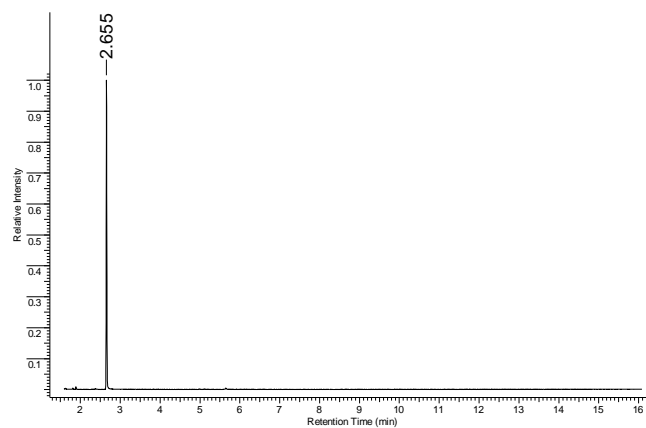
A. flavum subsp. *flavum*, Rtanj



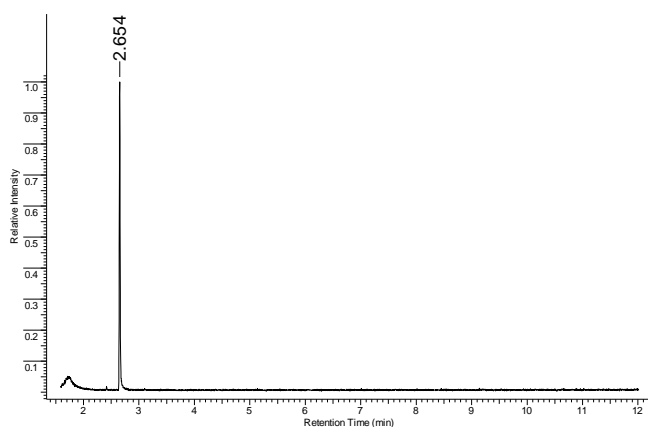
A. oleraceum, Rtanj



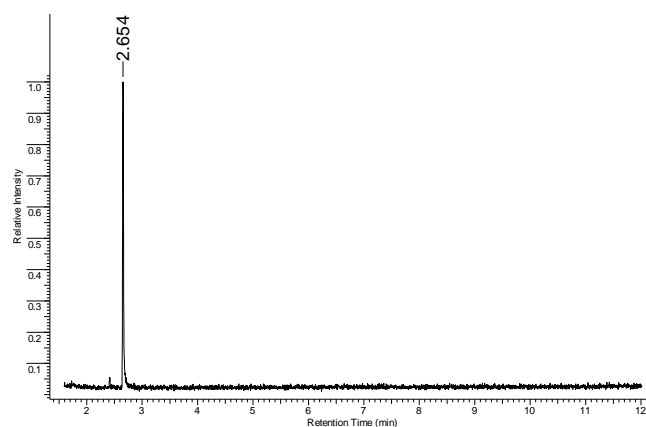
A. oleraceum, Kosmovac



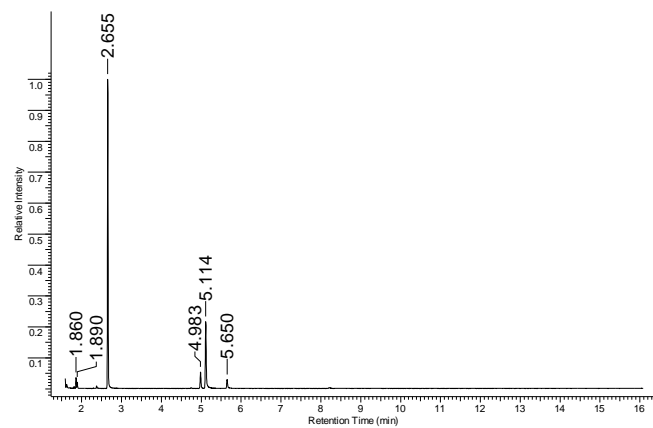
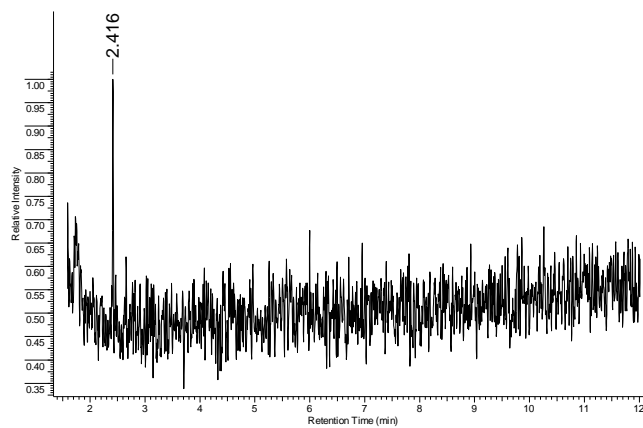
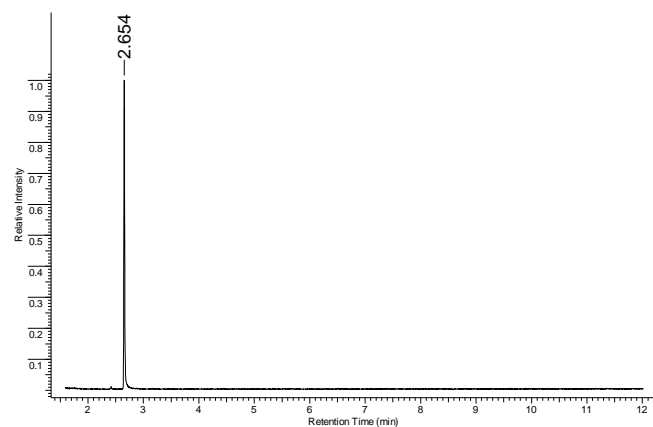
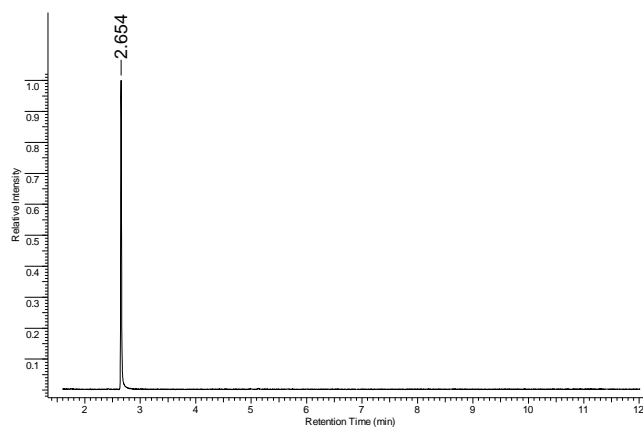
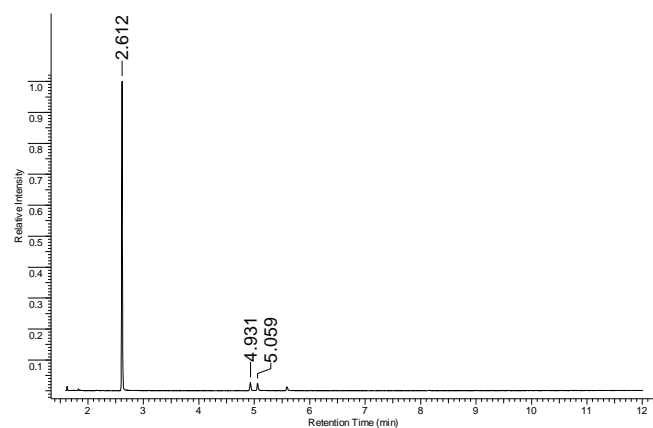
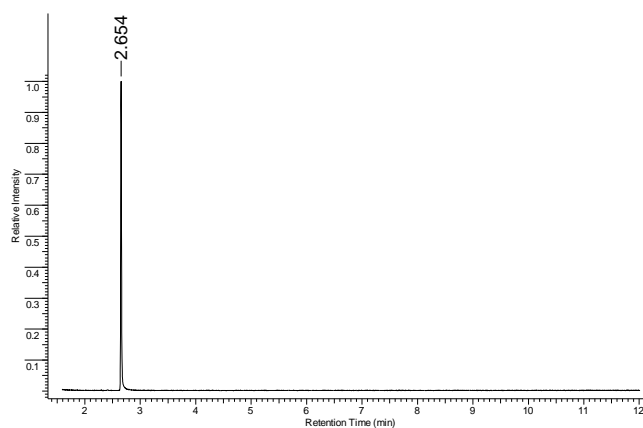
A. melanantherum, Čemernik



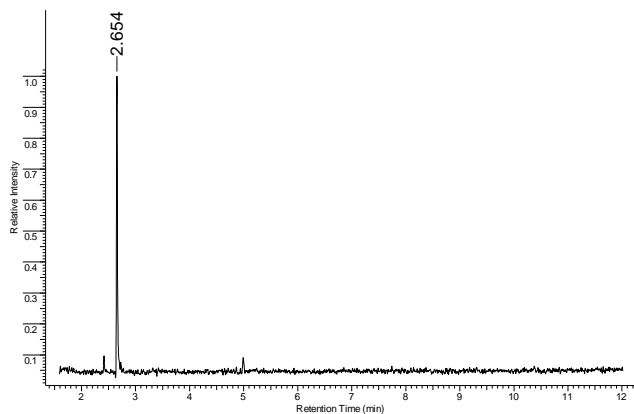
A. melanantherum, Plana



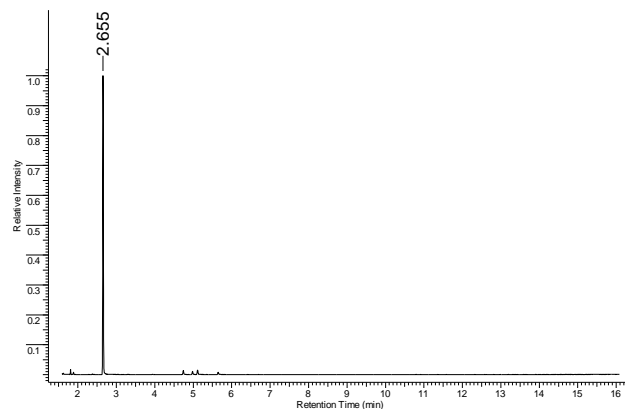
Slika 8.2. Headspace GC-MS hromatogrami uzoraka vrsta *A. flavum*, *A. oleraceum* i *A. melanantherum*

A. pallens, Beli Rzav*A. rhodopeum*, Dimitrovgrad*A. carinatum* subsp. *pulchelum*, Vlasinsko jezero*A. carinatum* subsp. *pulchelum*, Tara*A. carinatum* subsp. *carinatum*, Rtanj*A. carinatum* subsp. *carinatum*, ĆemernikSlika 8.3. Headspace GC-MS hromatogrami uzoraka vrsta *A. pallens*, *A. rhodopeum* i *A. carinatum*

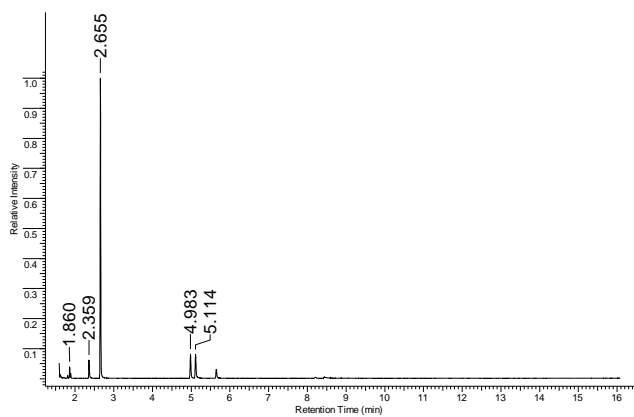
A. carinatum subsp. *carinatum*, Tara



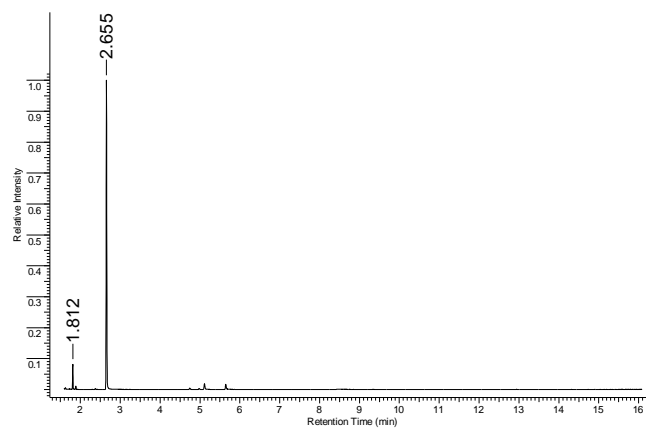
A. carinatum subsp. *carinatum*, Klisura Dervente



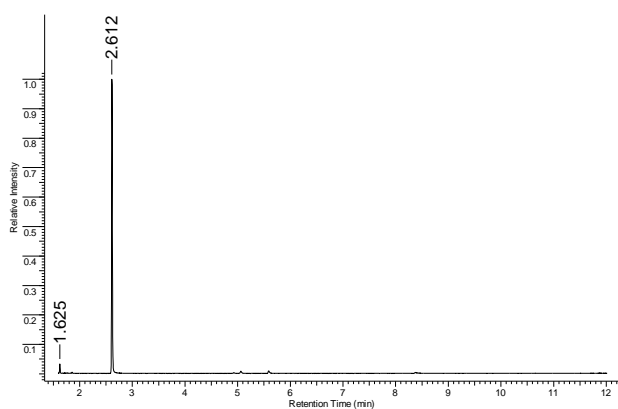
A. carinatum subsp. *carinatum*, Kaluđerske Bare



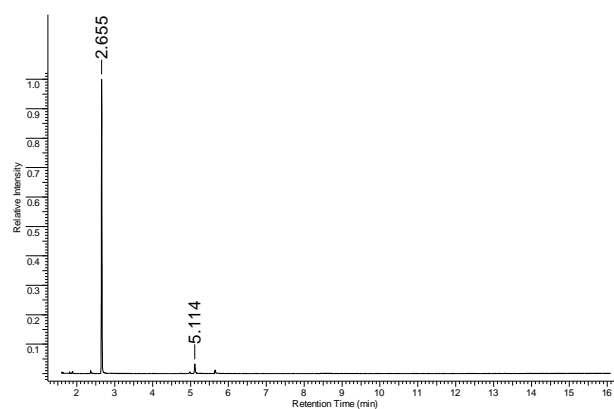
A. fuscum subsp. *fuscum*, Klisura Dervente



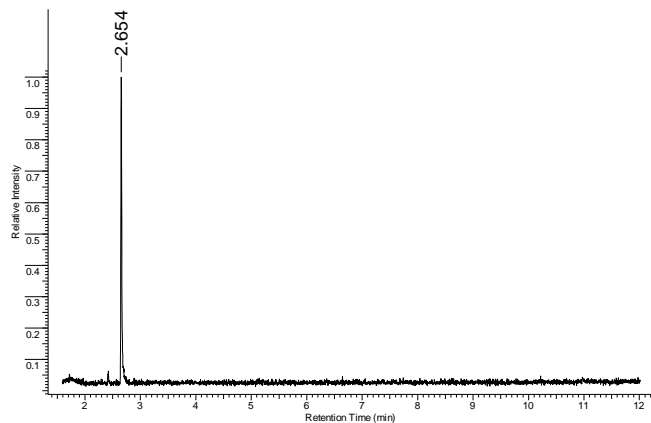
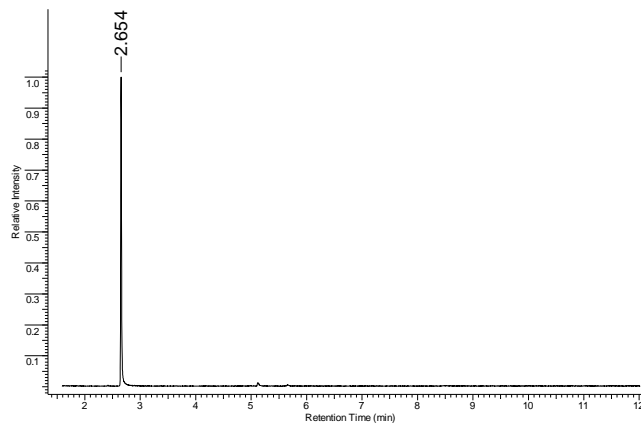
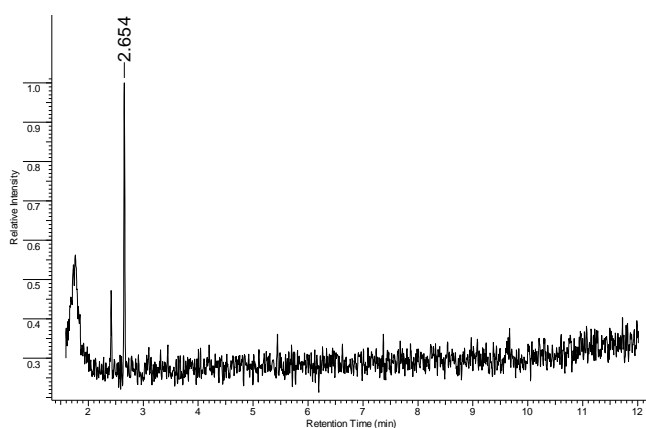
A. fuscum subsp. *fuscum*, Rtanj



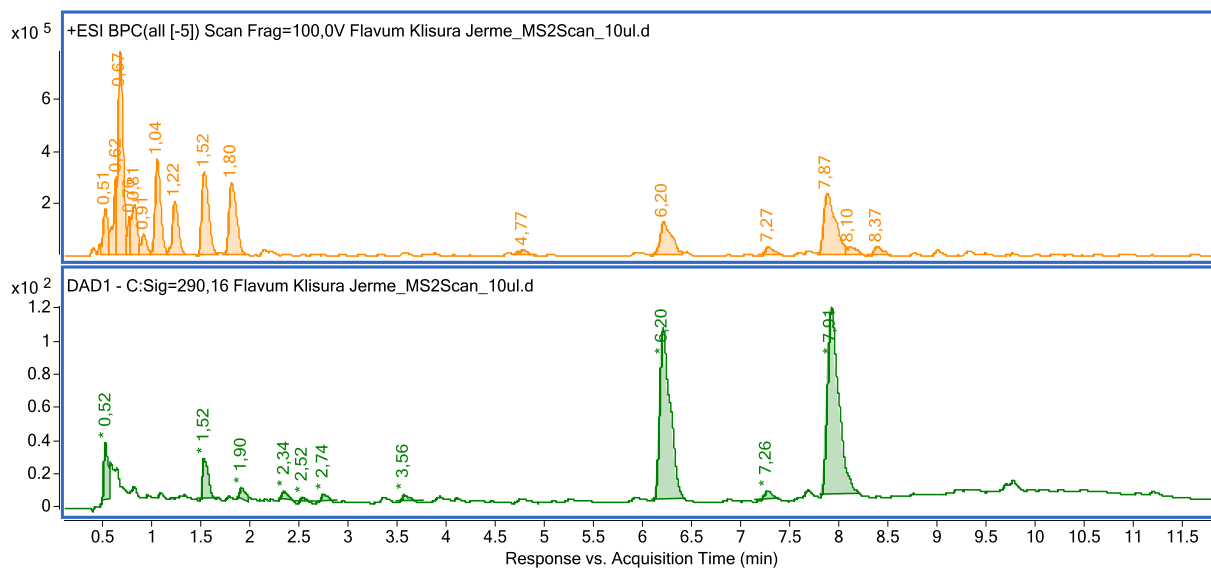
A. fuscum subsp. *fuscum*, Zaovine



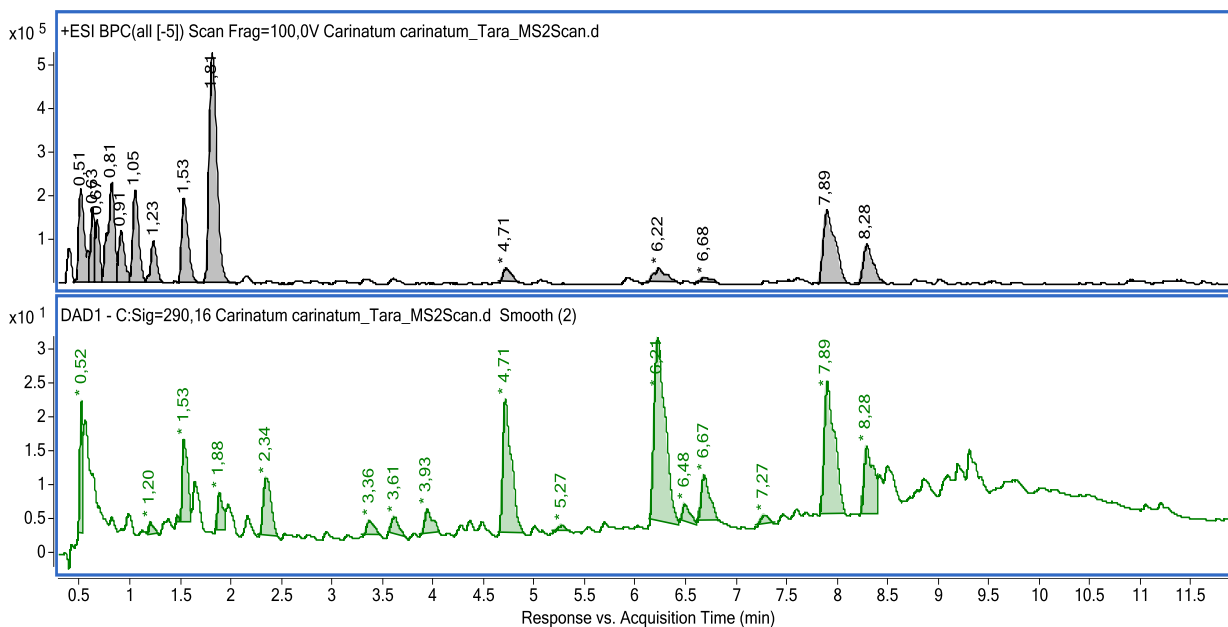
Slika 8.4. Headspace GC-MS hromatogrami uzoraka vrsta *A. carinatum* i *A. fuscum*

A. fuscum subsp. *fuscum*, Tara*A. fuscum* subsp. *fuscum*, Beli Rzav*A. paniculatum* subsp. *marginatum*, Titelski bregSlika 8.5. Headspace GC-MS hromatogrami uzoraka vrsta *A. fuscum* i *A. paniculatum*

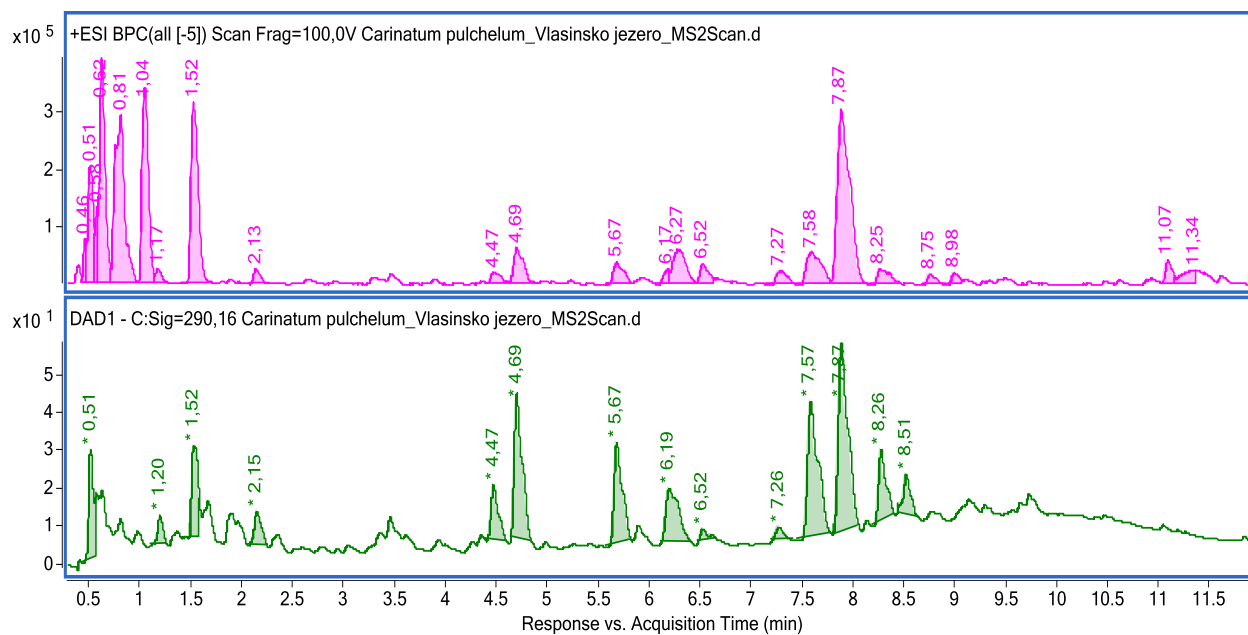
8.3. LC-DAD-MS I LC-MS-MS ANALIZA



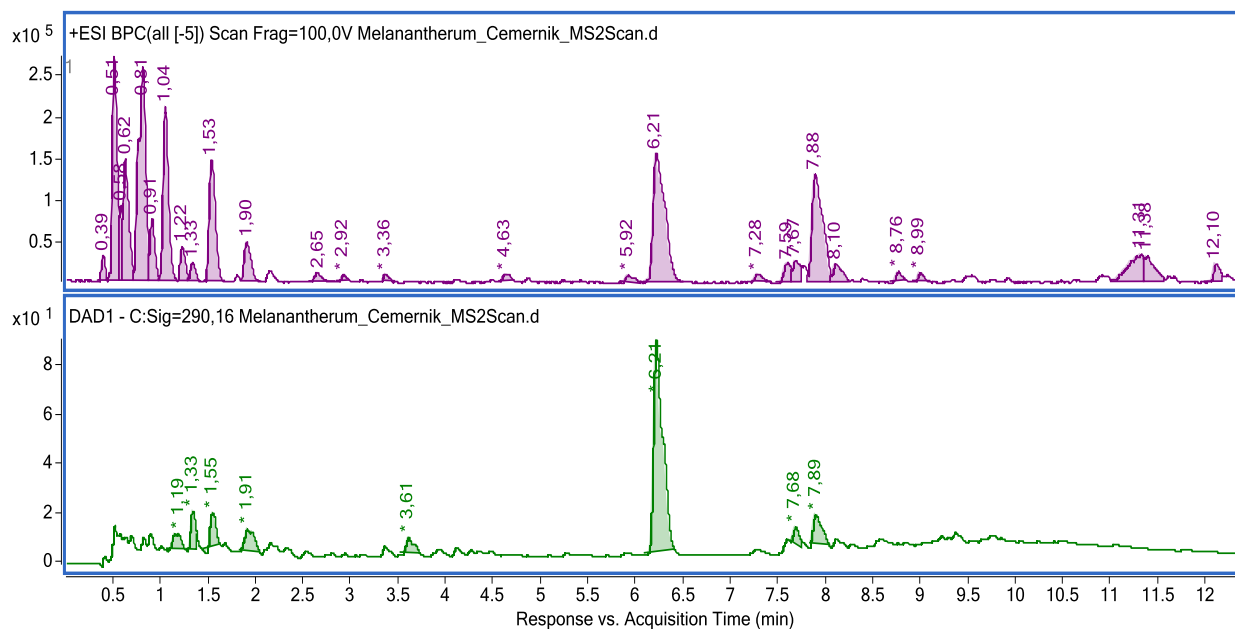
Slika 8.6. BPC i DAD (290 nm) hromatogrami ekstrakta vrste *A. flavum* subsp. *flavum*, Klisura Jerme



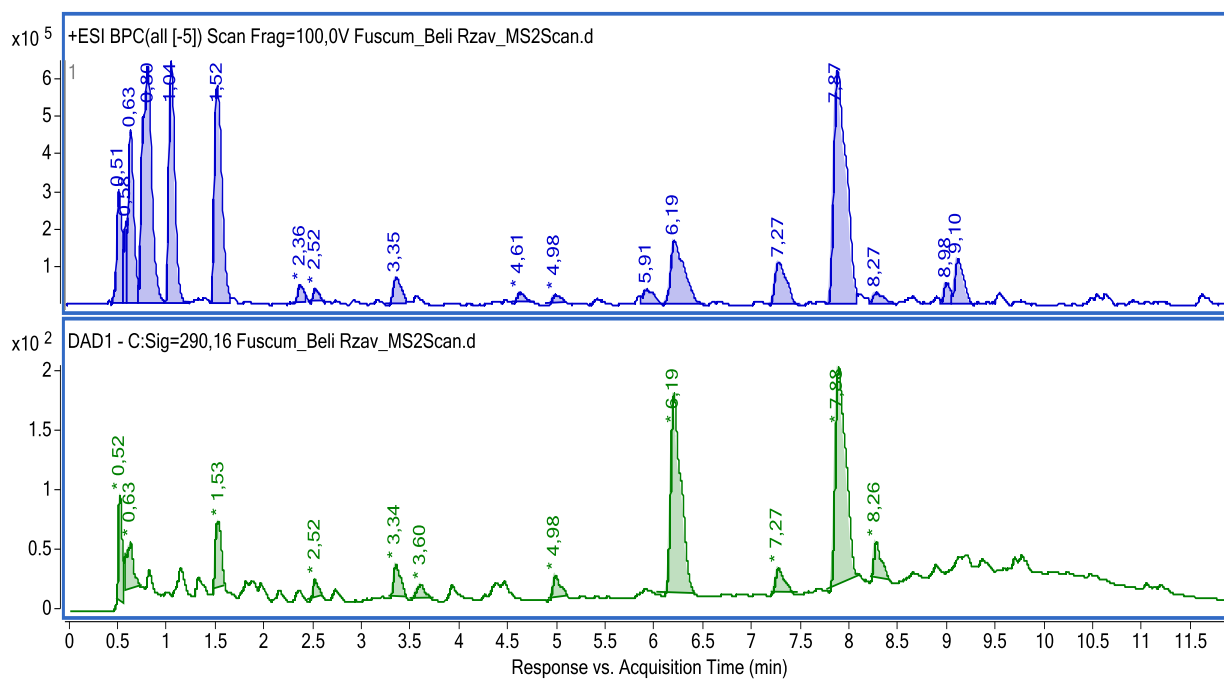
Slika 8.7. BPC i DAD (290 nm) hromatogrami ekstrakta vrste *A. carinatum* subsp. *carinatum*, Tara



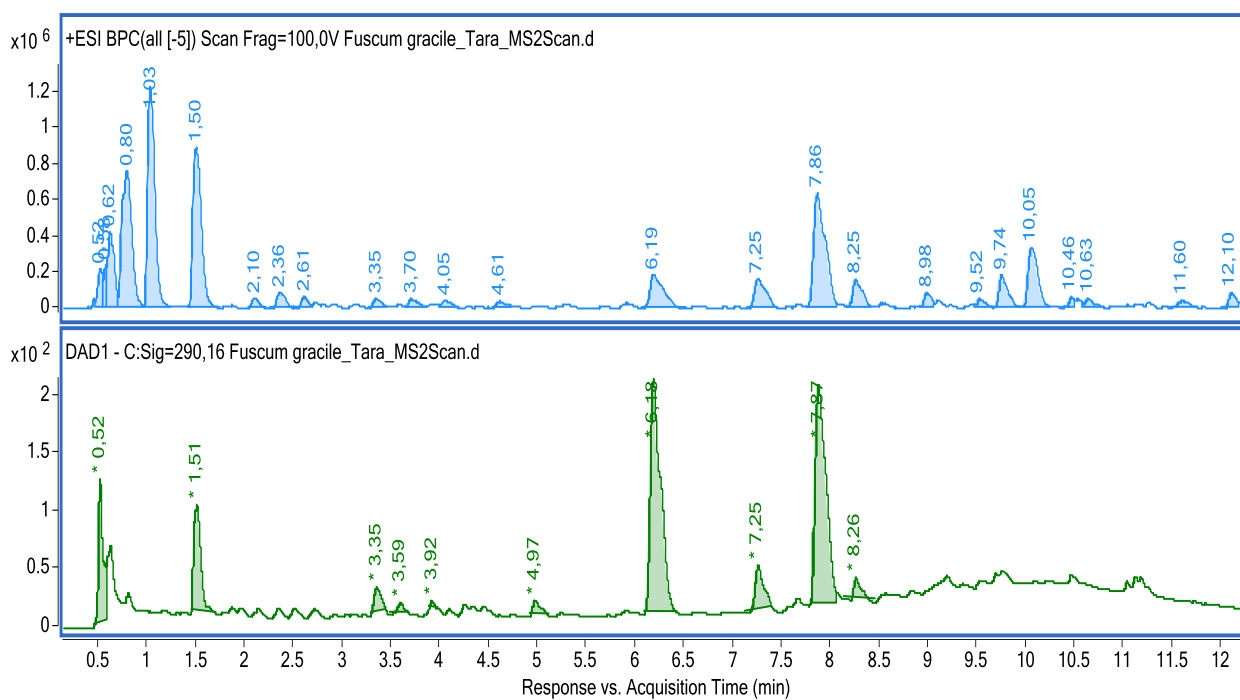
Slika 8.8. BPC i DAD (290 nm) hromatogrami ekstrakta vrste *A. carinatum* subsp. *pulchelum*, Vlasinsko jezero



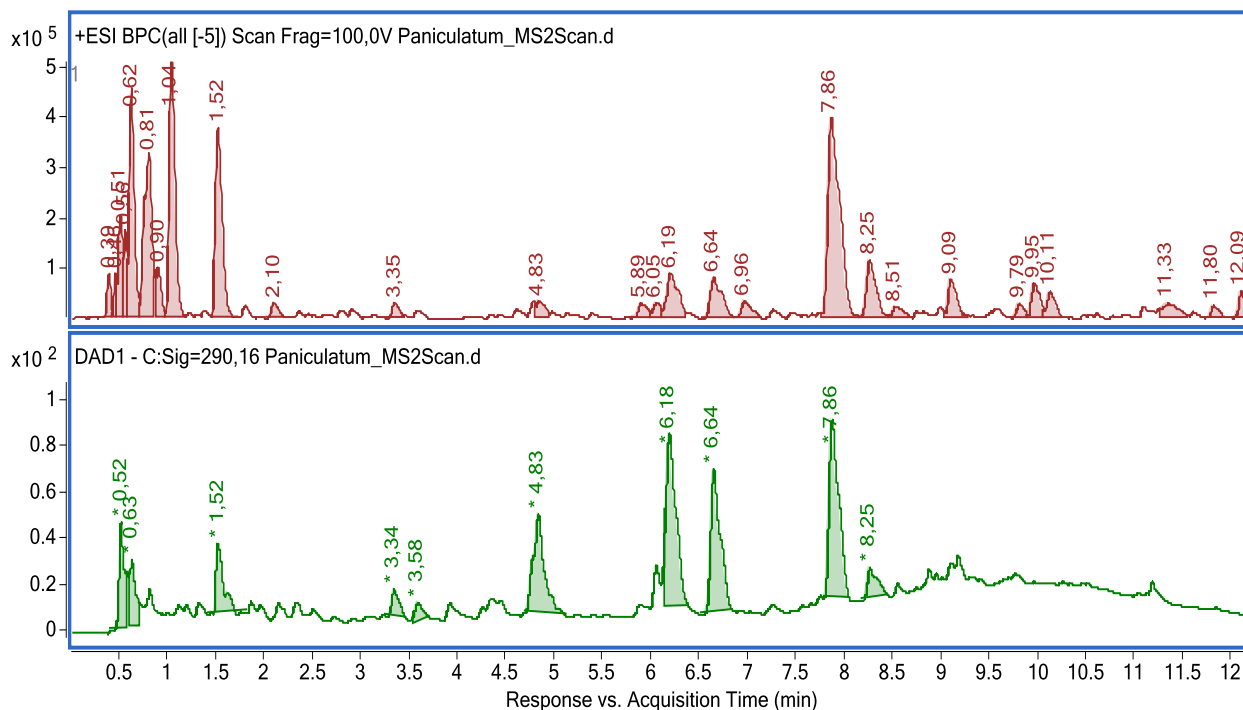
Slika 8.9. BPC i DAD (290 nm) hromatogrami ekstrakta vrste *A. melanantherum*, Čemernik



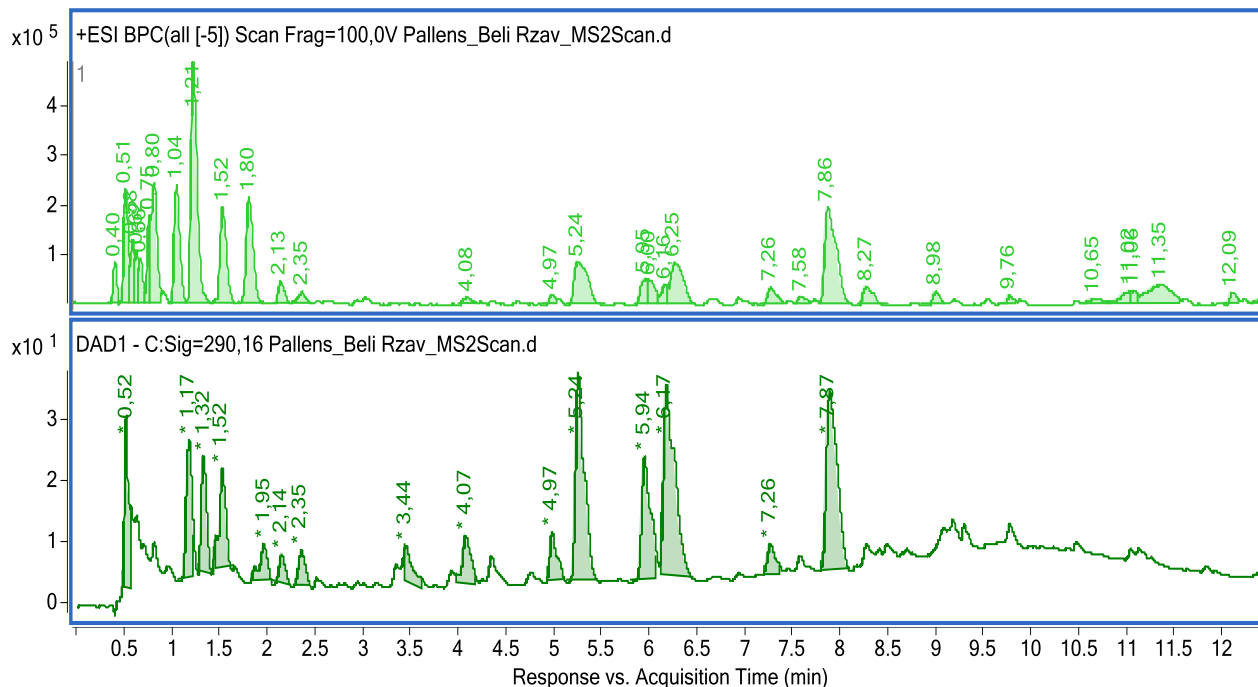
Slika 8.10. BPC i DAD (290 nm) hromatogrami ekstrakta vrste *A. fuscum* var. *fuscum*, Beli Rzav



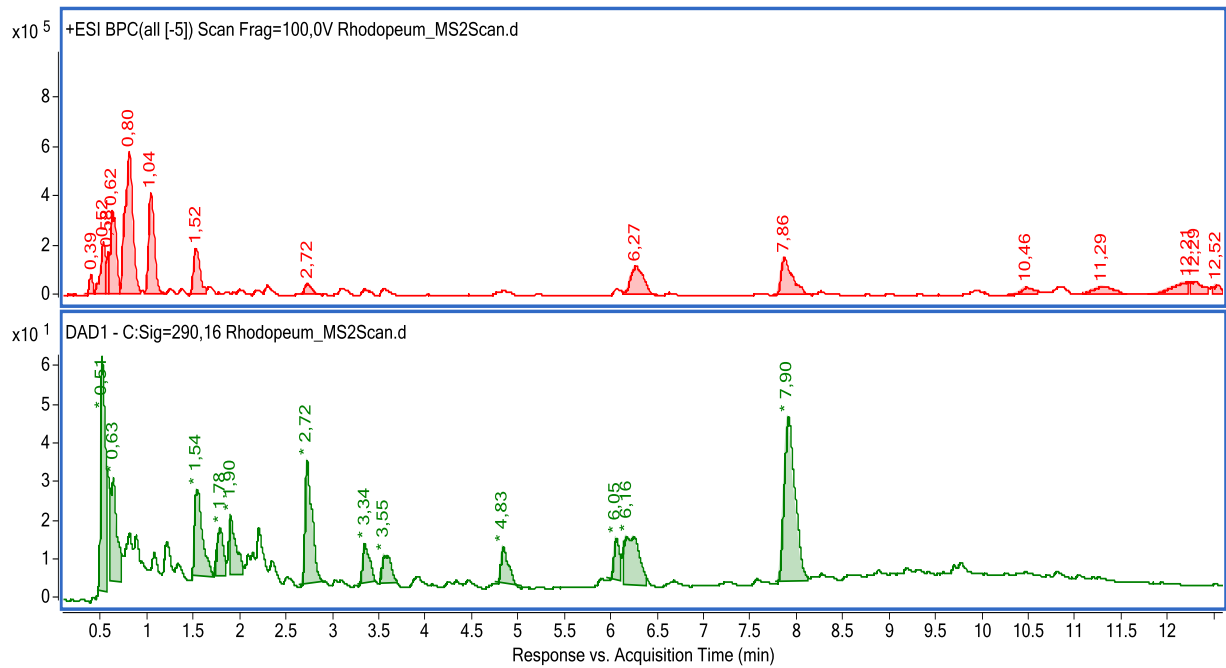
Slika 8.11. BPC i DAD (290 nm) hromatogrami ekstrakta vrste *A. fuscum* var. *gracile*, Tara



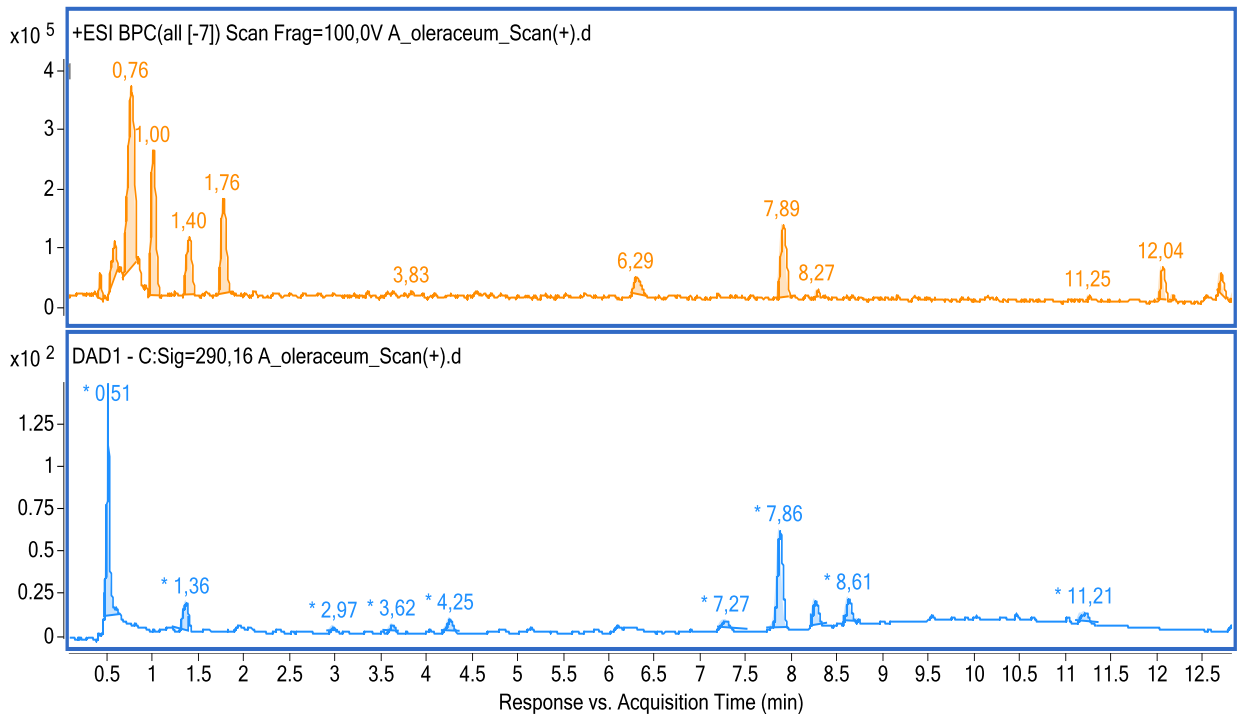
Slika 8.12. BPC i DAD (290 nm) hromatogrami ekstrakta vrste *A. paniculatum*, Titelski breg



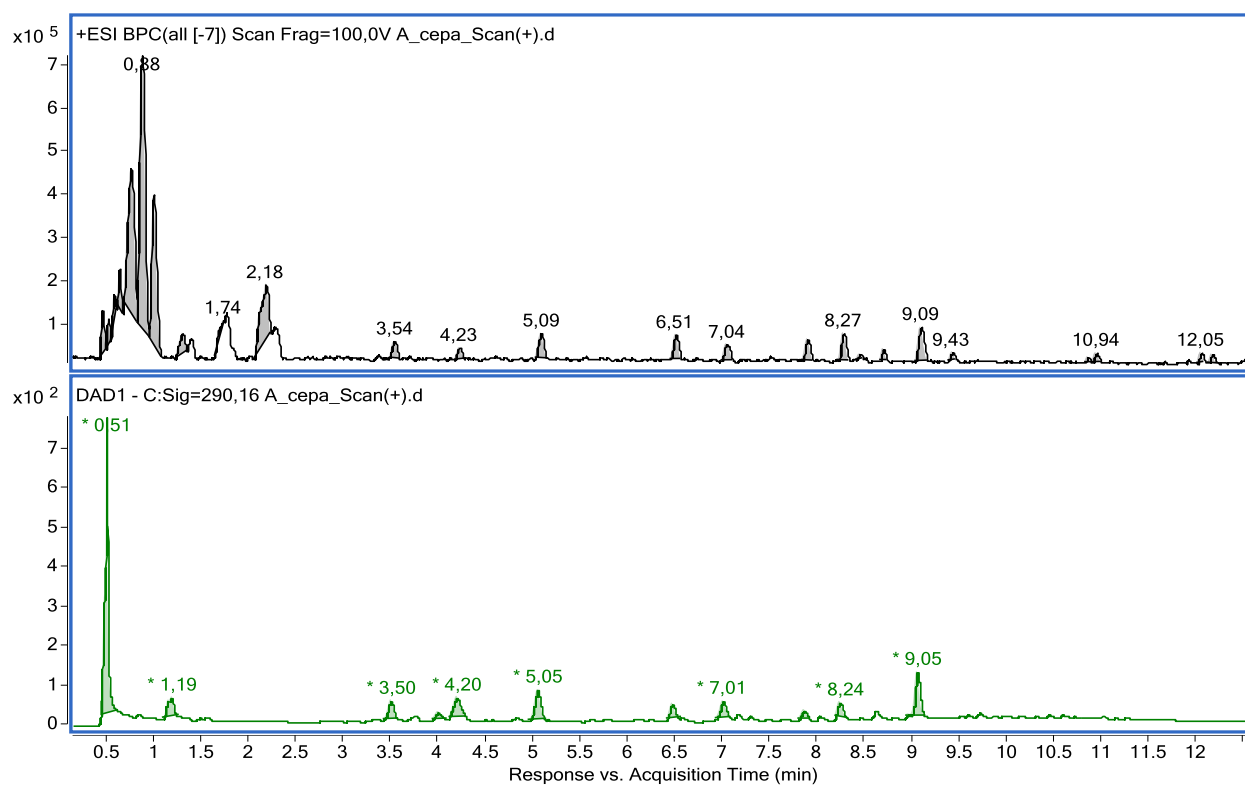
Slika 8.13. BPC i DAD (290 nm) hromatogrami ekstrakta vrste *A. pallens*, Beli Rzav



Slika 8.14. BPC i DAD (290 nm) hromatogrami ekstrakta vrste *A. rhodopeum*, Dimitrovgrad



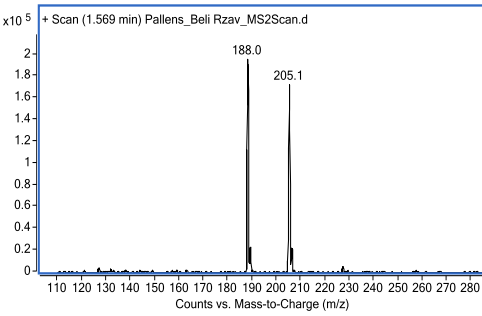
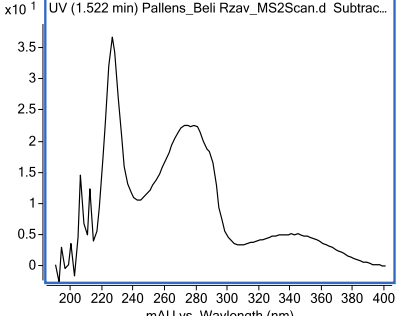
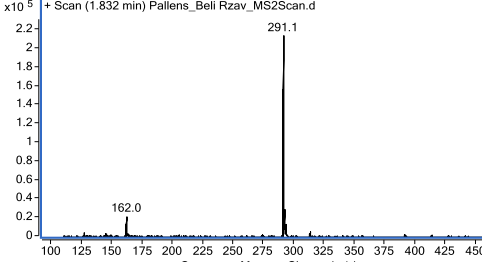
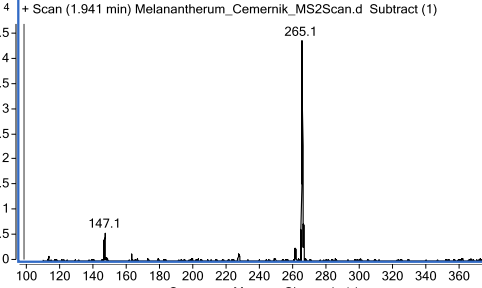
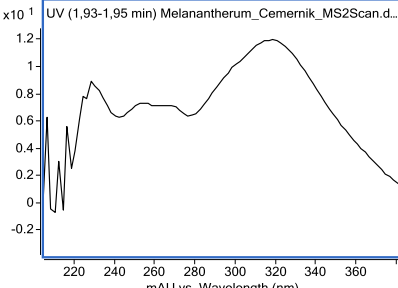
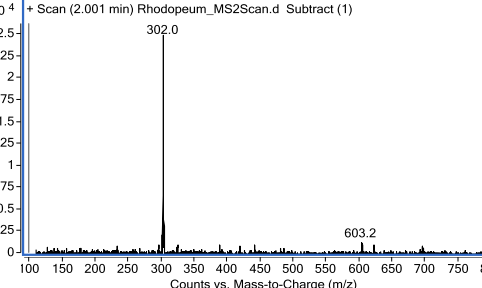
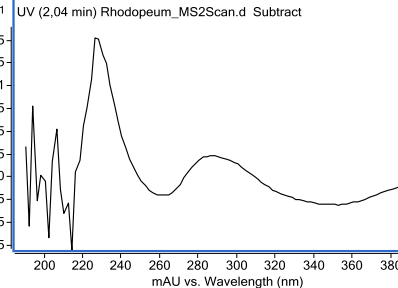
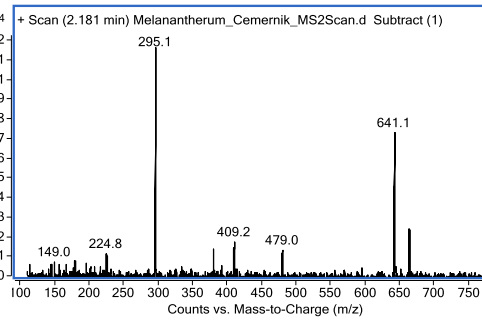
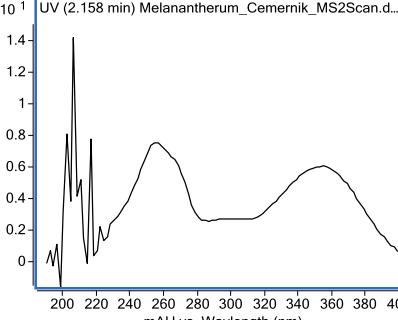
Slika 8.15. BPC i DAD (290 nm) hromatogrami ekstrakta vrste *A. oleraceum*, Kosmovac

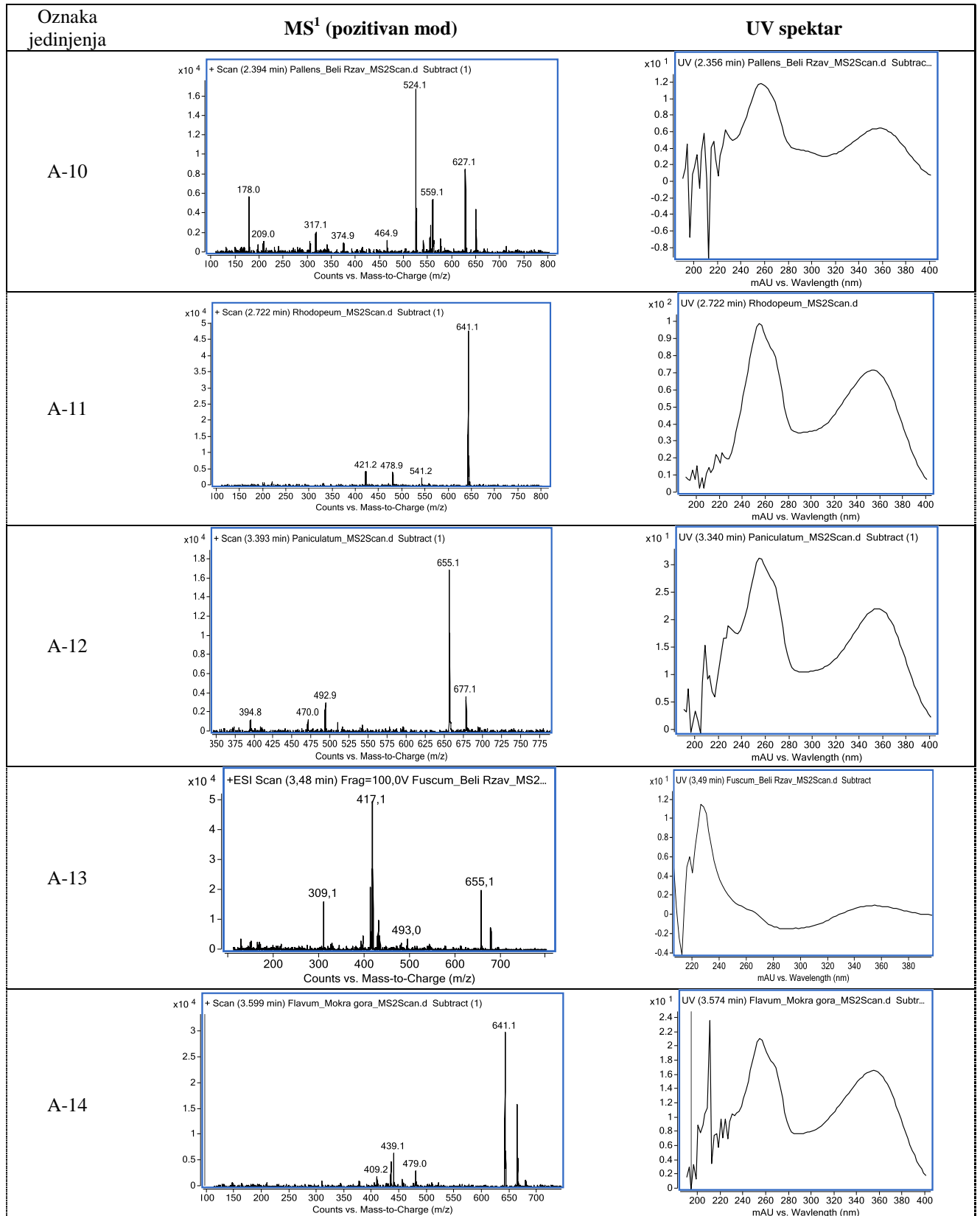


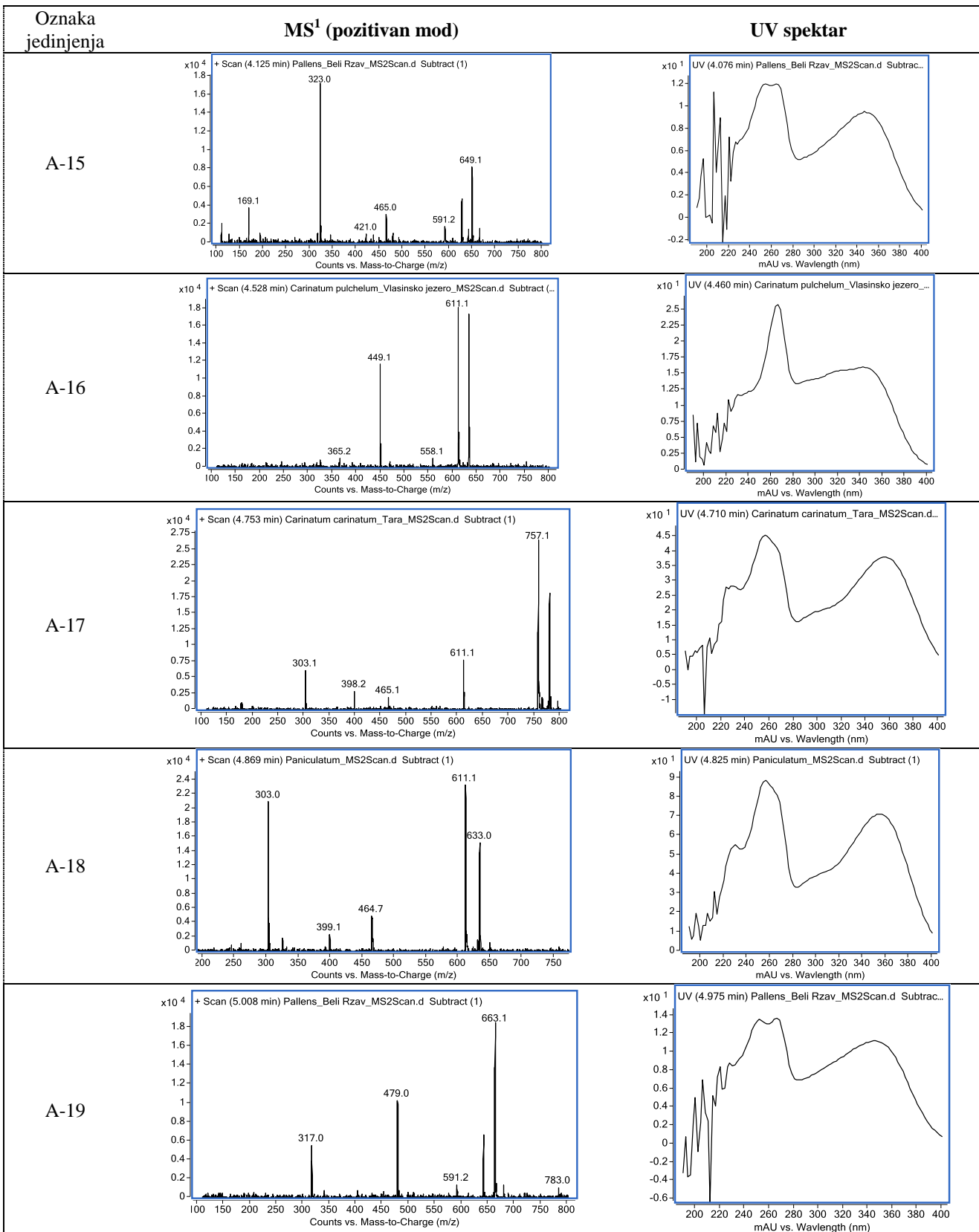
Slika 8.16. BPC i DAD (290 nm) hromatogrami ekstrakta vrste *A. cepa*, Neradin

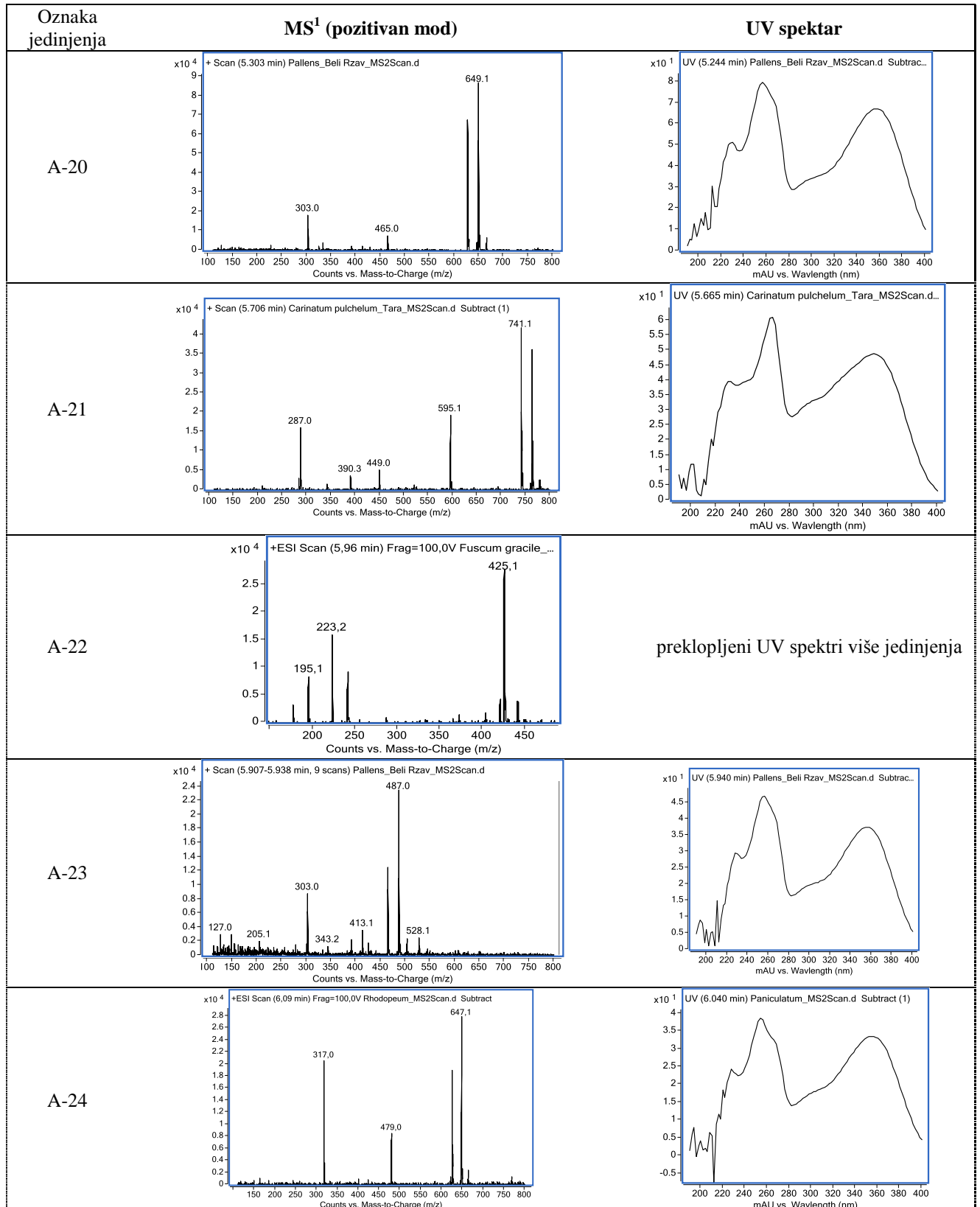
Tabela 8.2. ESI(+) MS¹ i UV spektri jedinjenja detektovanih u ekstraktima ispitivanih vrsta roda *Allium*

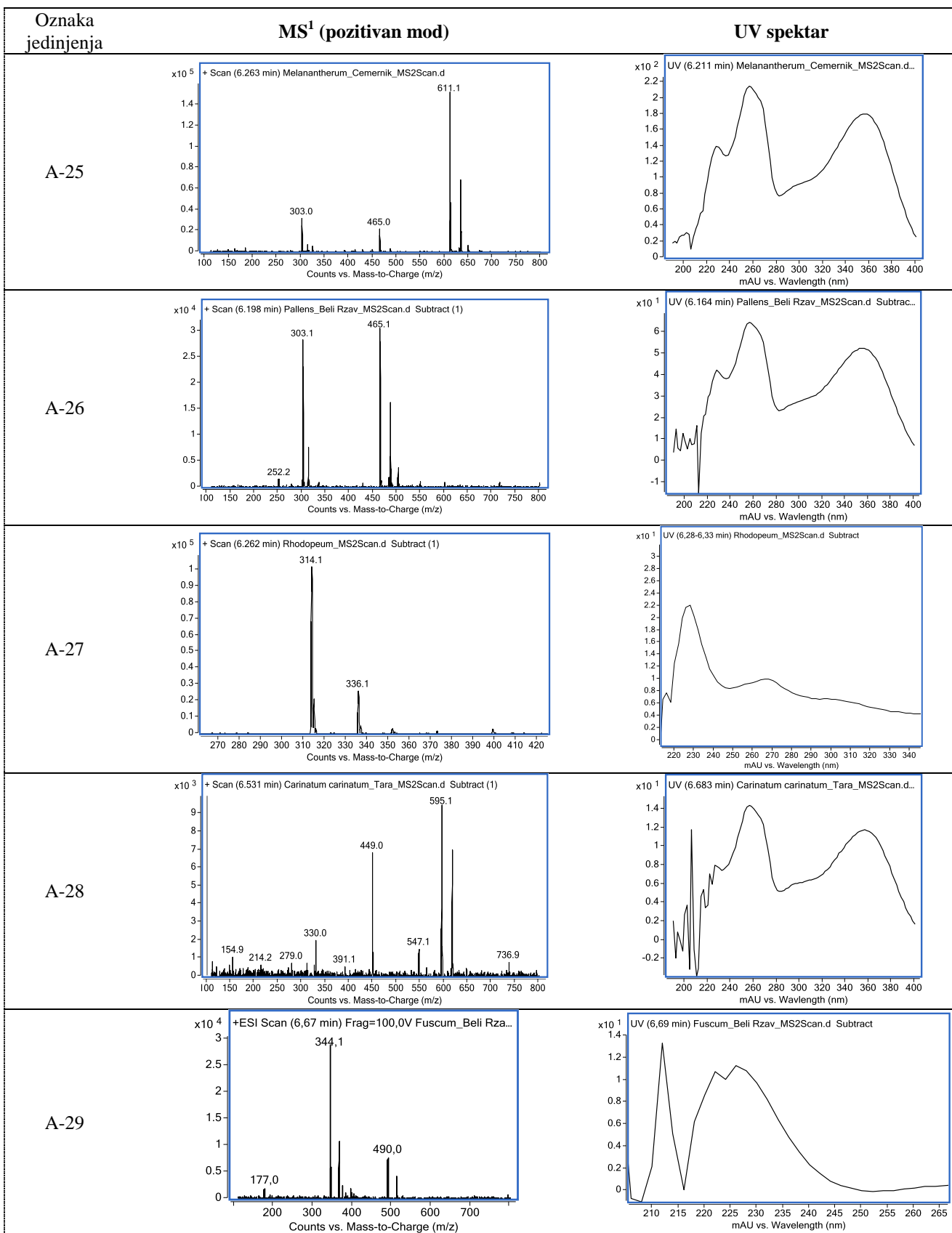
Oznaka jedinjenja	MS ¹ (pozitivan mod)	UV spektar
A-01	<p>+ESI Scan (0,71 min) Frag=100,0V Flavum_Mokra gora_MS2Scan.d Subtract</p>	<p>UV (0,71 min) Flavum_Mokra gora_MS2Scan.d Su...</p>
A-02	<p>+ Scan (0,805 min) Rhodopeum_MS2Scan.d</p>	<p>UV (0,805 min) Rhodopeum_MS2Scan.d Subtract (1)</p>
A-03	<p>+ Scan (1,041 min) Rhodopeum_MS2Scan.d Subtract (1)</p>	<p>UV (1,09 min) Flavum_Mokra gora_MS2Scan.d Su...</p>
A-04	<p>+ Scan (1,267 min) Pallens_Beli Rzav_MS2Scan.d</p>	nema UV spektar

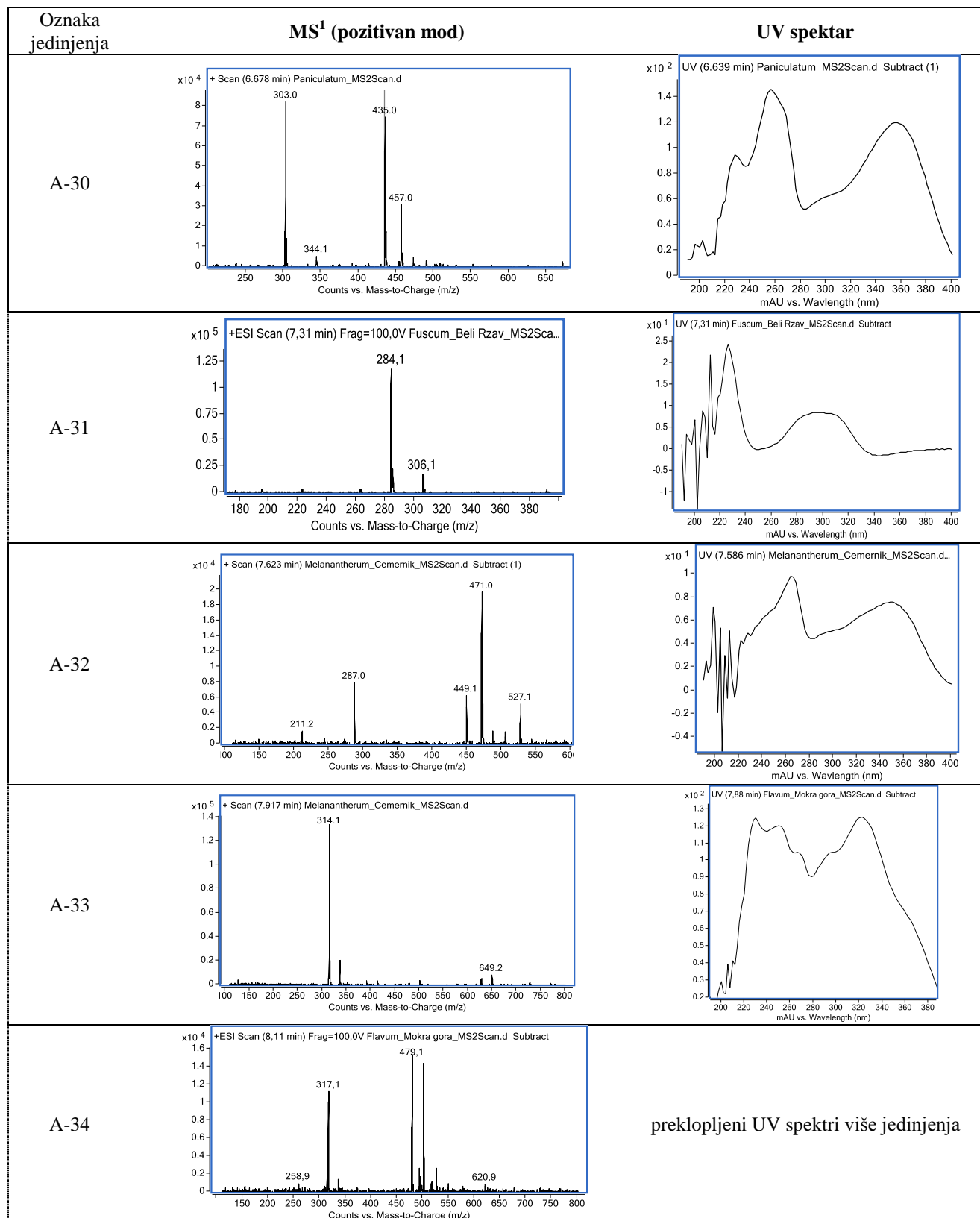
Oznaka jedinjenja	MS ¹ (pozitivan mod)	UV spektar
A-05	 <p>+ Scan (1.569 min) Pallens_Beli_Rzav_MS2Scan.d</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	 <p>UV (1.522 min) Pallens_Beli_Rzav_MS2Scan.d Subtrac...</p> <p>mAU vs. Wavelength (nm)</p>
A-06	 <p>+ Scan (1.832 min) Pallens_Beli_Rzav_MS2Scan.d</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	<p>nema UV spektar</p>
A-07	 <p>+ Scan (1.941 min) Melanatherum_Cemernik_MS2Scan.d Subtract (1)</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	 <p>UV (1.93-1.95 min) Melanatherum_Cemernik_MS2Scan.d...</p> <p>mAU vs. Wavelength (nm)</p>
A-08	 <p>+ Scan (2.001 min) Rhodopeum_MS2Scan.d Subtract (1)</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	 <p>UV (2.04 min) Rhodopeum_MS2Scan.d Subtract</p> <p>mAU vs. Wavelength (nm)</p>
A-09	 <p>+ Scan (2.181 min) Melanatherum_Cemernik_MS2Scan.d Subtract (1)</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	 <p>UV (2.158 min) Melanatherum_Cemernik_MS2Scan.d...</p> <p>mAU vs. Wavelength (nm)</p>











Oznaka jedinjenja	MS ¹ (pozitivan mod)	UV spektar
A-35	<p>+ Scan (8.165 min) Melanatherum_Cemernik_MS2Scan.d Subtract (1)</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	<p>UV (8.05 min) Flavum_Mokra_gora_MS2Scan.d Subtract</p> <p>mAU vs. Wavelength (nm)</p>
A-36	<p>+ Scan (8.328 min) Carinatum_carinatum_Tara_MS2Scan.d Subtract (1)</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	<p>UV (8.286 min) Carinatum_carinatum_Tara_MS2Scan.d...</p> <p>mAU vs. Wavelength (nm)</p>
A-37	<p>+ESI Scan (8,56 min) Frag=100,0V Carinatum_pulchellum_Tara_MS2Scan.d</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	<p>UV (8,56 min) Carinatum_pulchellum_Tara_MS2Scan.d Subtract</p> <p>mAU vs. Wavelength (nm)</p>
A-38	<p>+ Scan (9.025 min) Pallens_Beli_Rzav_MS2Scan.d Subtract (1)</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	nema UV spektar
A-39	<p>+ESI Scan (9,78 min) Frag=100,0V Fuscum_gracile_Tara_MS2Scan.d Subtr...</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	nema UV spektar
A-40	<p>+ Scan (10.001 min) Paniculatum_MS2Scan.d Subtract (1)</p> <p>Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)</p>	nema UV spektar

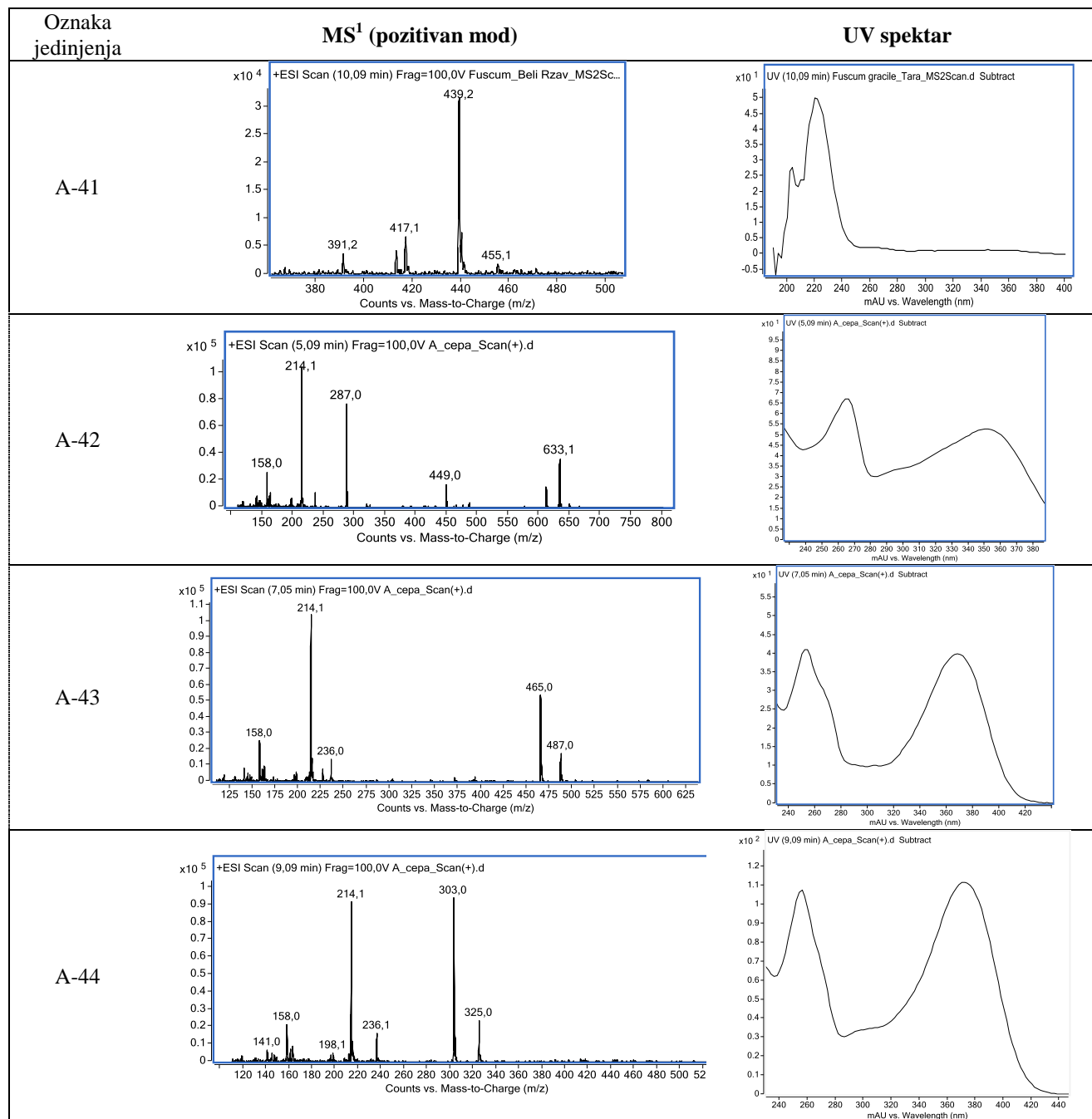
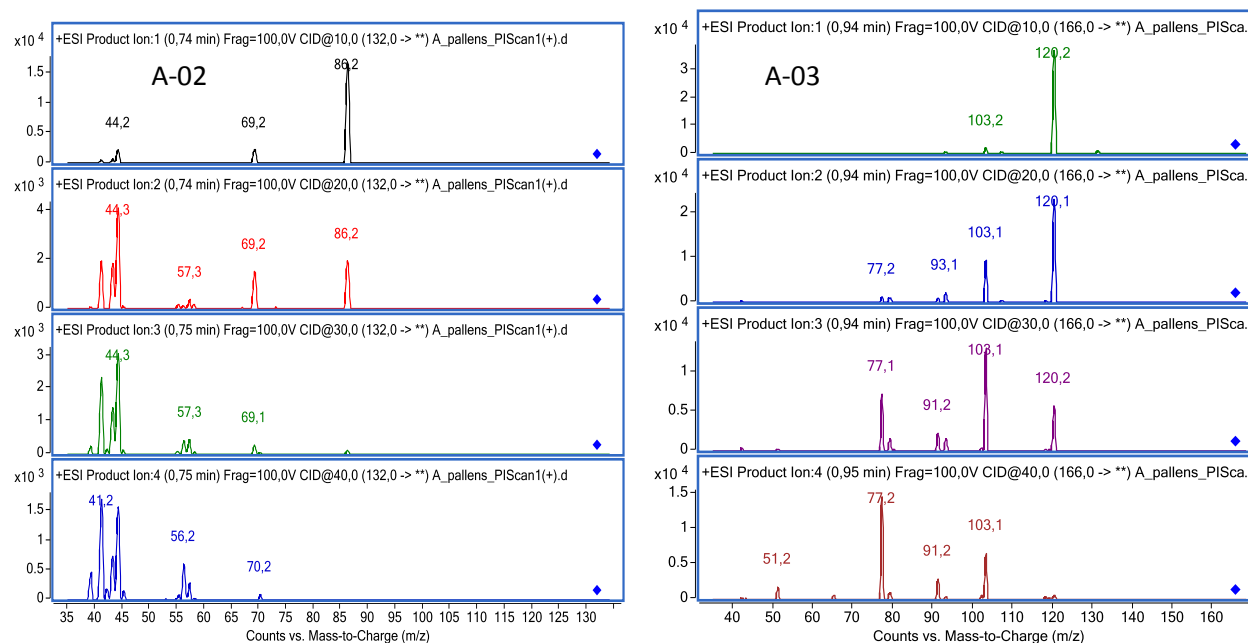


Tabela 8.3. MS¹ (pozitivna jonizacija) i UV spektri jedinjenja detektovanih u ekstraktima ispitivanih vrsta roda *Allium*

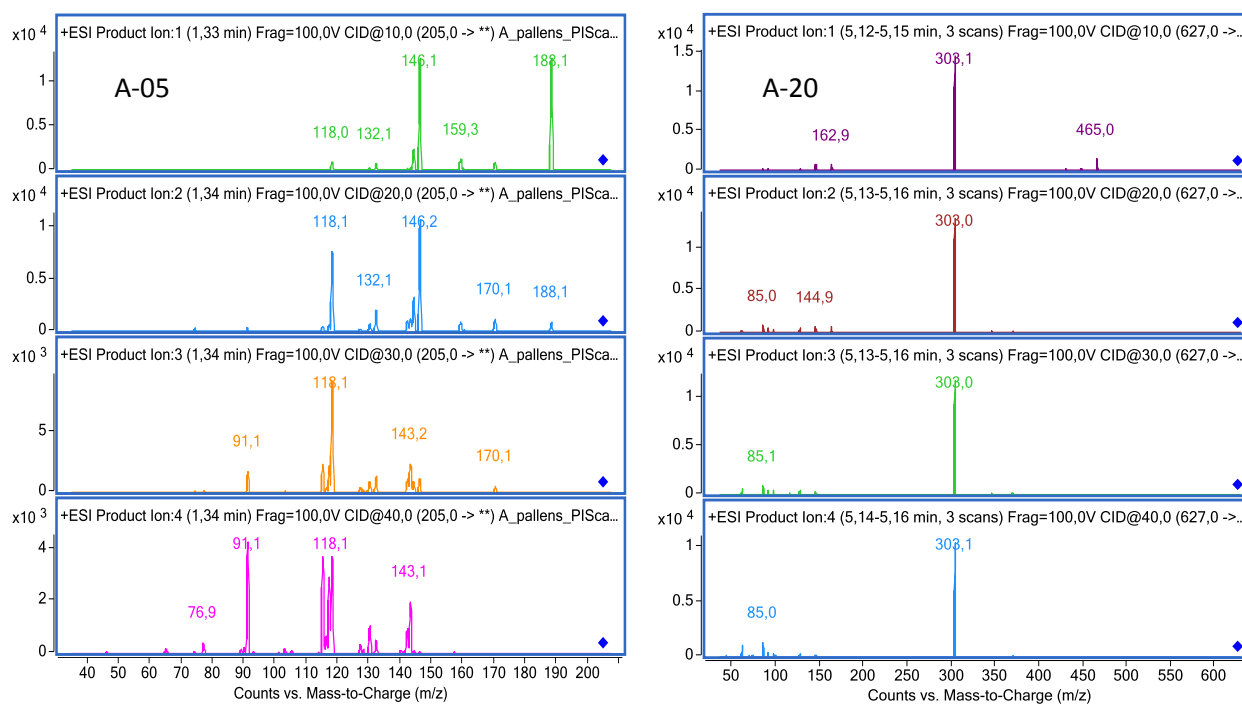
Oznaka	t _R [min]	MS ¹ /MS ²	UV maksimumi	Identifikacija
A-01	0,665	265 [M+H] ⁺	-	n. i.
A-02	0,81	132 [M+H] ⁺ , 86 [M+H-H ₂ O-CO] ⁺ , 69 [86-NH ₃] ⁺	228, 268	Leu/Ile
A-03	1,04	166 [M+H] ⁺ , 120 [M+H-H ₂ O-CO] ⁺	227, 268, 315	Phe
A-04	1,21	319 [M+Na] ⁺ , 297 [M+H] ⁺ , 168	-	jedinjenja sa 2 sumporna atoma - zaključeno iz M+2 izotopskih pikova
A-05	1,52	205 [M+H] ⁺ , 188	227, 279, 289sh	Trp
A-06	1,81	313 [M+Na] ⁺ , 291 [M+H] ⁺ , 162	-	S-propenil-γ-glutamylcistein [#]
A-07	1,94	265 [M+H] ⁺ , 147	228, 252, 268, 318	n. i.
A-08	2,03	603 [2M+H] ⁺ , 302 [M+H] ⁺	228, 284	n. i.
A-09	2,18	663 [M+Na] ⁺ , 641 [M+H] ⁺ , 479 [M+H-162] ⁺	254, 266sh, 296sh, 352	MeQuerHex ₂ *
A-10	2,39	665 [M+K] ⁺ , 649 [M+Na] ⁺ , 627 [M+H] ⁺ , 465[M+H-162] ⁺	258, 292sh, 355	Quer-3,x-Hex ₂
A-11	2,77	641 [M+H] ⁺ , 479 [M+H-162] ⁺	254, 267sh, 352	MeQuerHex ₂ *
A-12	3,35	693 [M+K] ⁺ , 677 [M+Na] ⁺ , 655 [M+H] ⁺ , 493 [M+H-162] ⁺	254, 268sh, 354	MeQuerHexHexA*
A-13	3,50	677 [M+Na] ⁺ , 655 [M+H] ⁺ , 493 [M+H-162] ⁺	254, 268sh, 352	MeQuerHexHexA*
A-14	3,59	641 [M+H] ⁺ , 479 [M+H-162] ⁺	254, 268sh, 352	MeQuerHex ₂ *
A-15	4,08	649 [M+ Na] ⁺ , 627 [M+H] ⁺ , 465 [M+H-162] ⁺	252, 264, 350	Quer-3,x-Hex ₂
A-16	4,46	633 [M+Na] ⁺ , 611 [M+H] ⁺ , 449 [M+H-162] ⁺ , 287 [449-162] ⁺	265, 348	(Kemferol/Luteolin) Hex ₂
A-17	4,7	779 [M+Na] ⁺ , 757 [M+H] ⁺ , 611 [M+H-146] ⁺ , 465 [611-146], 303 [465-162] ⁺	256, 266sh, 295sh, 354	Quer dHex ₂ Hex (Quer(Rha)(RhaGlc)/Quer(Rha ₂ Glc)
A-18	4,87	649 [M+K] ⁺ , 633 [M+Na] ⁺ , 611 [M+H] ⁺ , 465 [M+H-146] ⁺ , 303 [465-162]	256, 266sh, 296sh, 354	Quer dHex Hex
A-19	4,98	679 [M+K] ⁺ , 663[M+Na] ⁺ , 641 [M+H] ⁺ , 479 [M+H-162] ⁺ , 317 [479-162] ⁺	252, 266, 345	MeQuerHex ₂ *
A-20	5,236	665 [M+K] ⁺ , 649 [M+Na] ⁺ ,], 627 [M+H] ⁺ , 465 [M+H-162] ⁺ , 303 [465-162]	256, 268sh, 296sh, 356	Quer-3,5-Hex ₂
A-21	5,72	763 [M+Na] ⁺ , 741 [M+H] ⁺ , 595 [M+H-146] ⁺ , 449 [595-162], 287 [449-162] ⁺	265, 296sh, 348	(Kemferol/Luteolin) dHexHex ₂
A-22	5,89	441 [M+K] ⁺ 425 [M+Na] ⁺ , 403 [M+H] ⁺ , 241 [M+H-162], 223 [241-H ₂ O], 195 [223-CO], 177 [195-H ₂ O],	preklopljeni uv	n. i.

Oznaka	t _R [min]	MS ¹ /MS ²	UV maksimumi	Identifikacija
A-23	5,95	503 [M+K] ⁺ , 487 [M+Na] ⁺ , 465 [M+H] ⁺ , 303 [M+H-162] ⁺	256, 268sh, 294sh, 355	Quer-3- <i>O</i> -Hex
A-24	6,09	663 [M+K] ⁺ , 647 [M+Na] ⁺ , 625 [M+H] ⁺ , 479 [M+H-146] ⁺ , 317 [479-162] ⁺	254, 267sh, 300sh, 355	MeQuer HexPent*
A-25	6,2	633 [M+Na] ⁺ , 611 [M+H] ⁺ , 465 [M+H-146] ⁺ , 303 [465-162] ⁺	256, 266sh, 294sh, 354	rutin
A-26	6,18	487 [M+Na] ⁺ , 465 [M+H] ⁺ , 303 [M+H-162] ⁺ ,	256, 266sh, 298sh, 354	Quer-3- <i>O</i> -Hex
A-27	6,3	336 [M+H] ⁺ , 314	228, 268	n. i.
A-28	6,53	617 [M+Na] ⁺ , 595 [M+H] ⁺ , 449 [M+H-146] ⁺	256, 268, 296, 356	Quer dHex ₂
A-29	6,62	344 [M+H] ⁺ , 177	226	n.i.
A-30	6,70	473 [M+K] ⁺ , 457 [M+Na] ⁺ , 435 [M+H] ⁺ , 303 [M+H-132] ⁺	256, 268sh, 296sh, 354	Quer-3- <i>O</i> -Pent
A-31	7,24	306 [M+Na] ⁺ , 284 [M+H] ⁺	226, 290	n. i.
A-32	7,62	487 [M+K] ⁺ , 471 [M+Na] ⁺ , 449 [M+H] ⁺ , 287 [M+H-162] ⁺	265, 294sh, 348	(Kemferol/Luteolin)-3- <i>O</i> -Hex
A-33	7,90	649 [2M+Na] ⁺ , 627 [2M+H] ⁺ , 336 [M+Na] ⁺ , 314 [M+H] ⁺	228, 250sh, 268, 293sh, 320	n. i.
A-34	8,00	501 [2M+Na] ⁺ , 479 [M+H] ⁺ , 317 [479-162]	preklopljeni uv	MeQuer Hex *
A-35	8,17	647 [M+Na] ⁺ , 625 [M+H] ⁺	254, 268sh, 355	MeQuer dHexHex *
A-36	8,30	709 [2M+Na] ⁺ , 687 [2M+H] ⁺ , 366 [M+Na] ⁺ , 344 [M+H] ⁺ , 177	240, 289, 318	n. i.
A-37	8,55	769 [2M+Na] ⁺ , 747 [2M+H] ⁺ , 374 [M+H] ⁺	226, 268, 324	n. i.
A-38	9,03	647 [2M+Na] ⁺ , 625 [2M+H] ⁺	-	n. i.
A-39	9,78	571 [M+H] ⁺	-	n. i.
A-40	9,954	250 [M+Na] ⁺ , 228 [M+H] ⁺	-	n. i.
A-41	10,10	455 [M+K] ⁺ , 439 [M+Na] ⁺ , 417 [M+H] ⁺	220	n. i.
A-42	5,09	633 [M+Na] ⁺ , 611 [M+H] ⁺ , 449 [M+H-162] ⁺ , 287 [449-162] ⁺	265, 294sh, 348	(Kemferol/Luteolin) Hex ₂
A-43	7,04	487[M+Na] ⁺ , 465[M+H] ⁺	256, 266sh, 365	QuerHex
A-44	9,09	325[M+Na] ⁺ , 303[M+H] ⁺	256, 296sh, 372	Quer

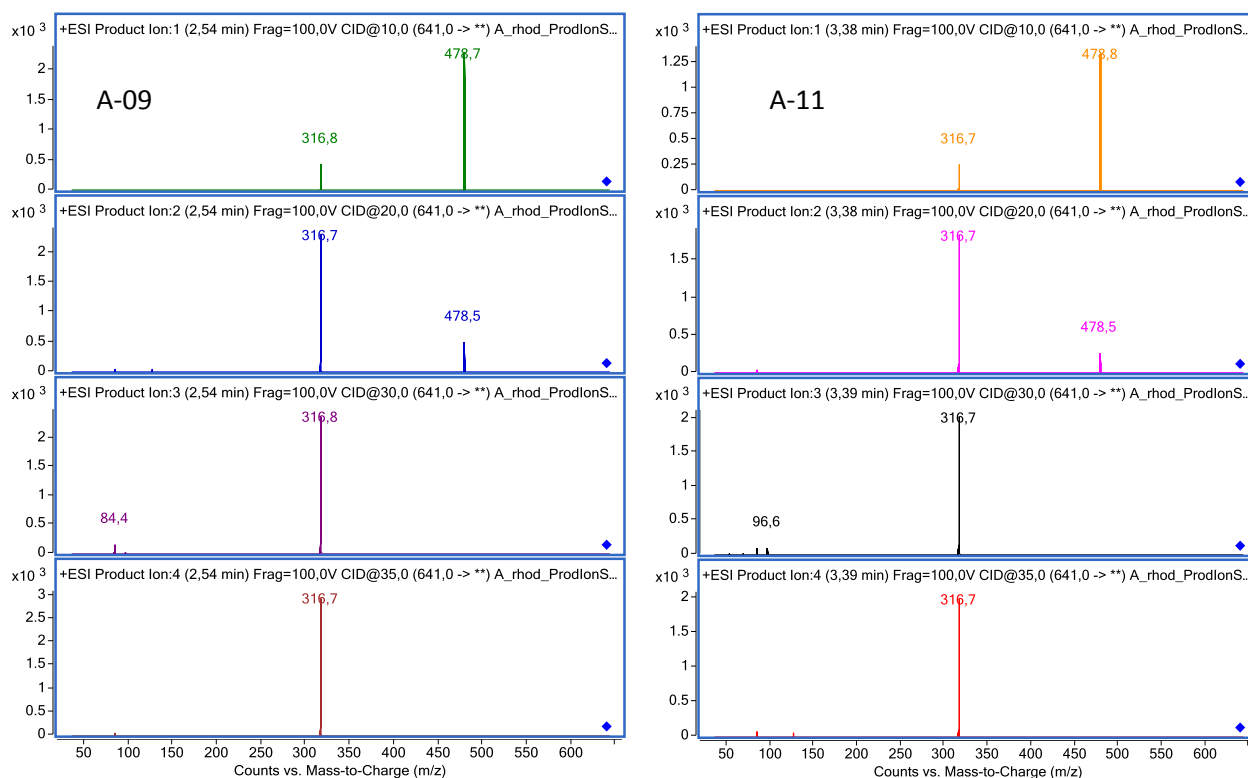
#γ-glutamil-S-propenil-L-cistein ili γ-glutamil-S-alil-L-cistein, *MeQuer – ramnetin ili izoramnetin, Quer – kvercetin, Hex – heksozil, Pent – pentozil, dHex – deoksiheksozil, HexA – heksuronska kiselina



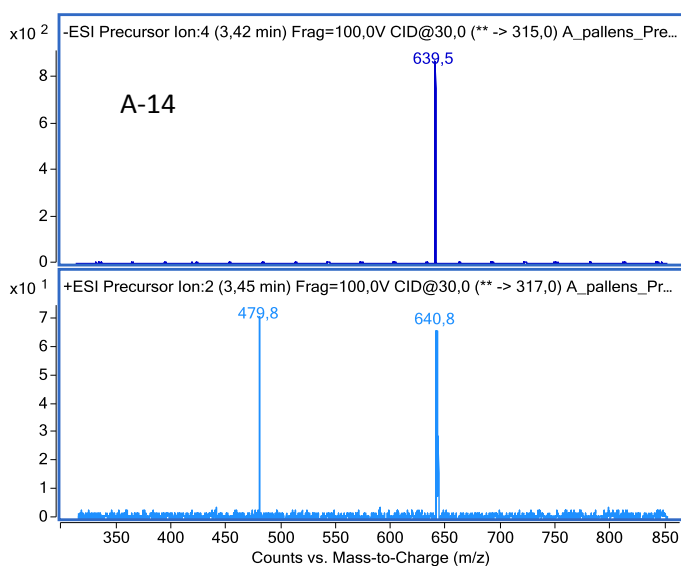
Slika 8.17. MS² spektri jona 132 (jedinjenje A-02) i 165 (jedinjenje A-03) u pozitivnom Product Ion Scan modu pri kolizionim energijama od 10 V, 20 V, 30 V i 35 V, snimljeni za uzorak *A. pallens*



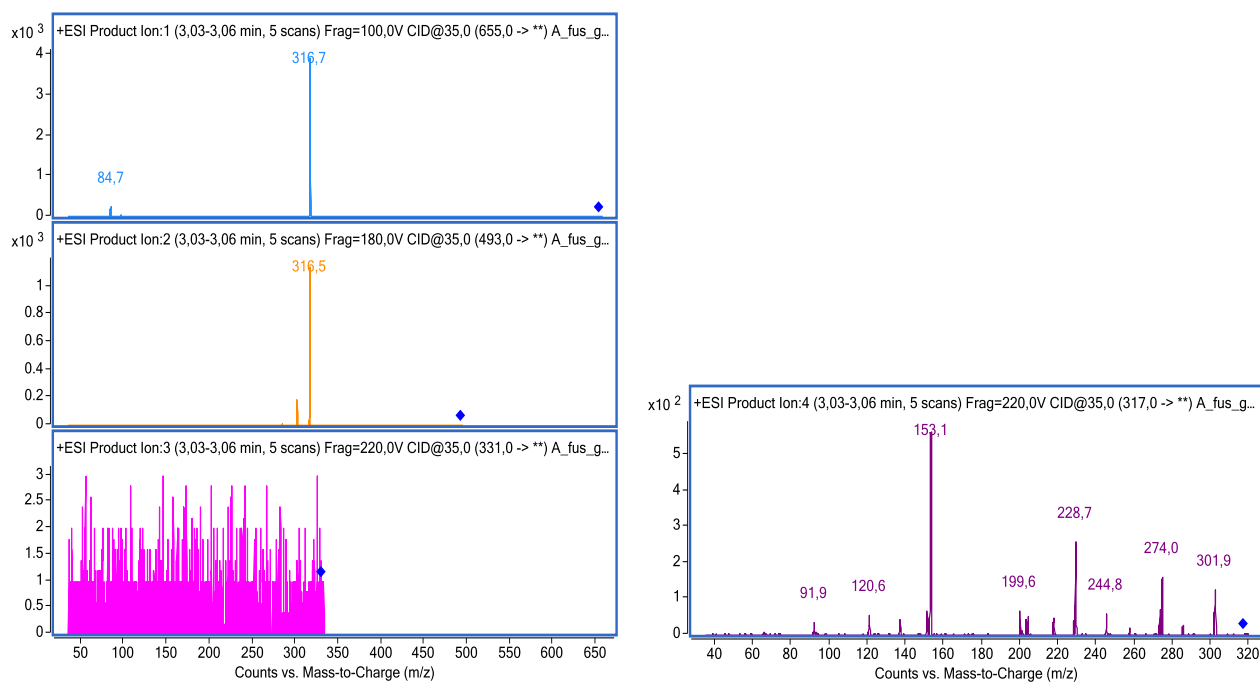
Slika 8.18. MS² spektri jona 205 (jedinjenje A-05) i 627 (jedinjenje A-20) u pozitivnom Product Ion Scan modu pri kolizionim energijama od 10 V, 20 V, 30 V i 35 V, snimljeni za uzorak *A. pallens*



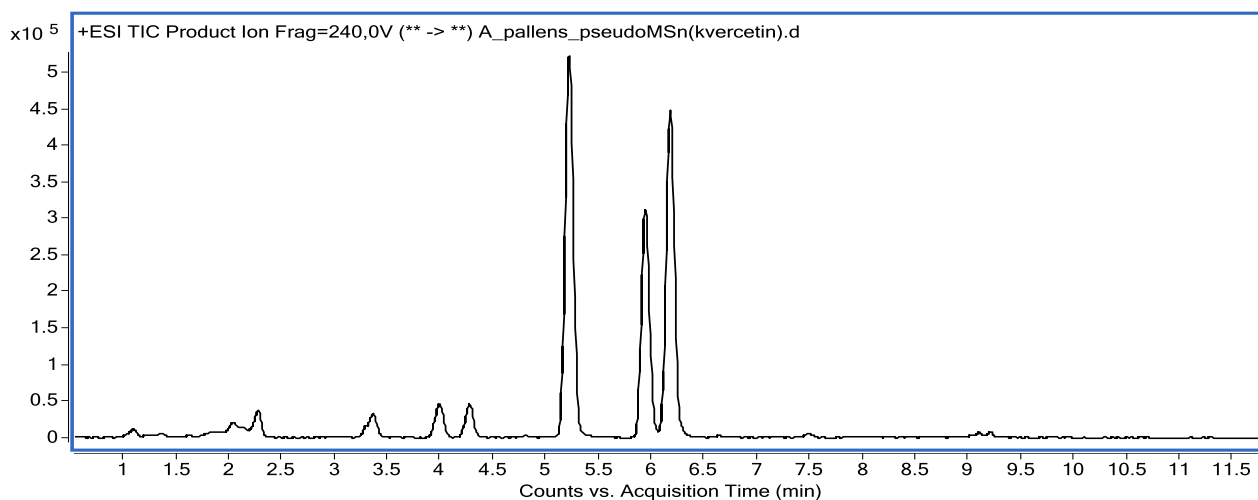
Slika 8.19. MS² spektri jona 641 u pozitivnom Product Ion Scan modu pri različitim kolizionim energijama (10 V, 20 V, 30 V i 35 V), snimljeni za uzorak *A. rhodopeum*. Jon 641 javlja se MS¹ spektru jedinjenja A-09, A-11



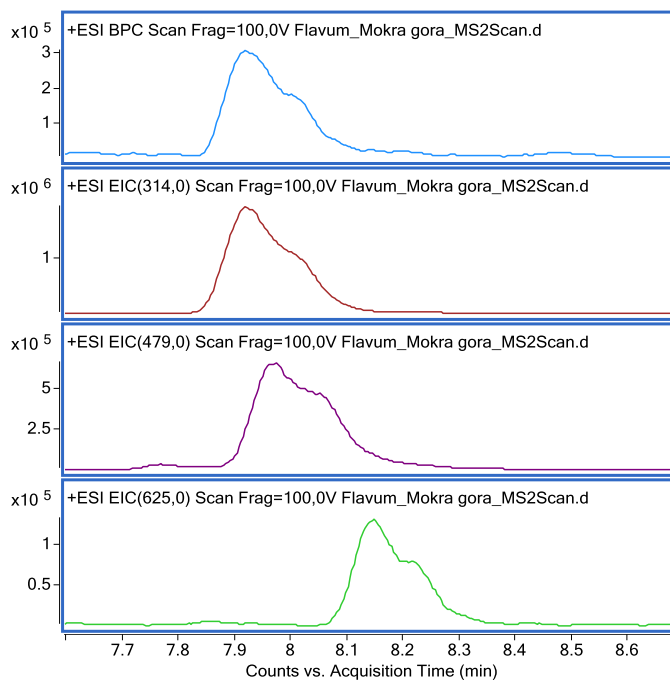
Slika 8.20. MS² spektri za jon 317 u pozitivnom Precursor Ion Scan modu i 315 u negativnom modu (napon fragmentora 100 V, napon koliziono ćelije 30 V), snimljeni za uzorak *A. pallens*. Jon 641 javlja se u MS¹ spektru jedinjenja A-14



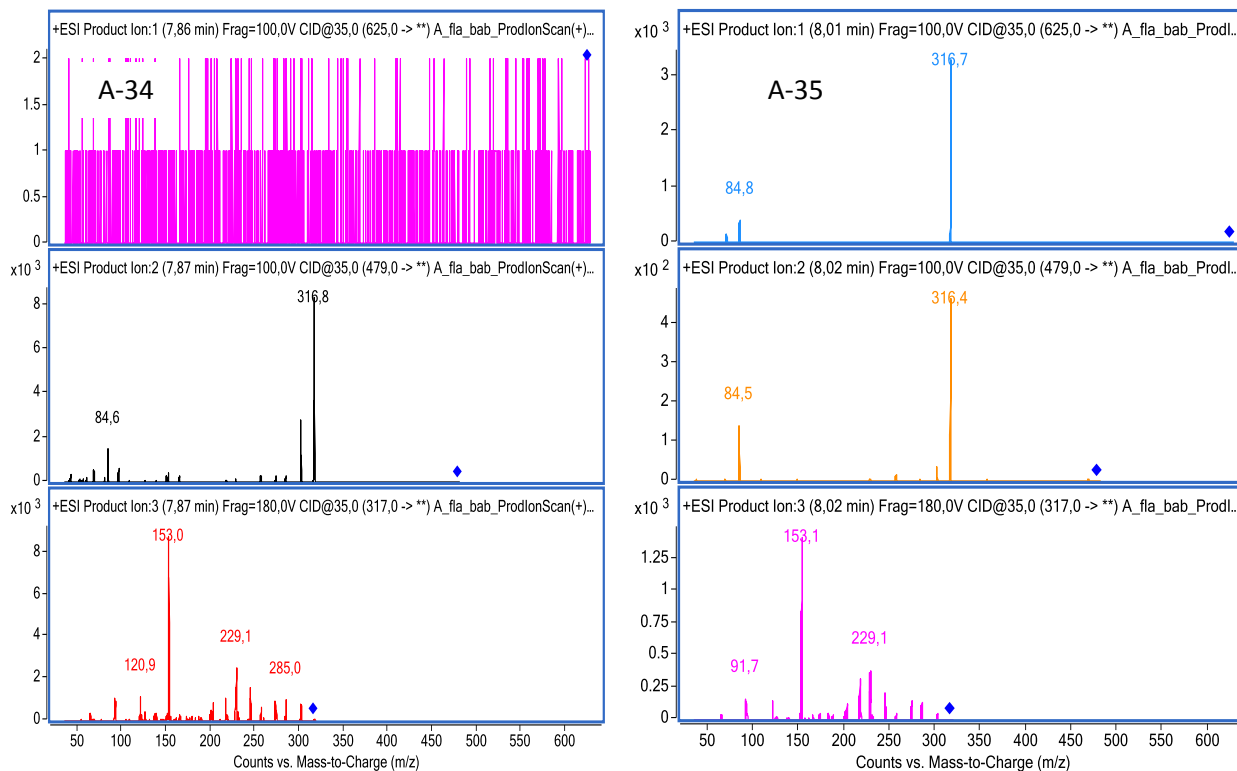
Slika 8.21. MS² spektri jona 655 i 493 i pseudo MS³ spektar jona 317 pri kolizionoj energiji od 35 V i naponu fragmentora od 100-220 V, snimljeni za uzorak *A. fuscum* var. *gracile*. Jon 655 javlja se MS¹ spektru jedinjenja A-12 i A-13.



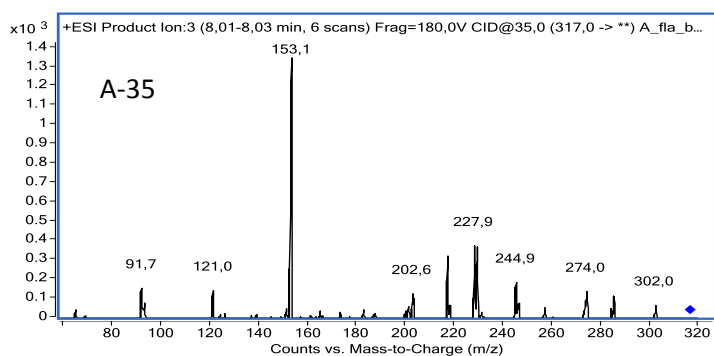
Slika 8.22. (+)ESI TIC hromatogram Pseudo MS³ eksperimenta za jon 303, pri naponu fragmentora od 240 V i kolizionim energijama od 10 V, 20 V, 30 V i 40 V, snimljeni za uzorak *A. pallens*.



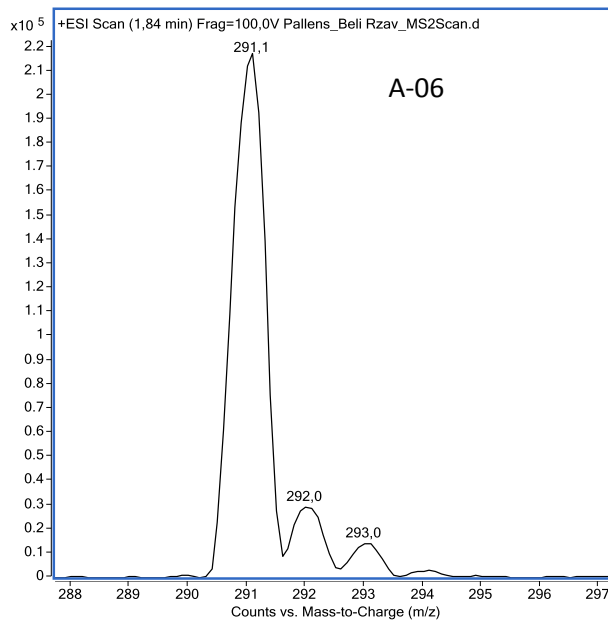
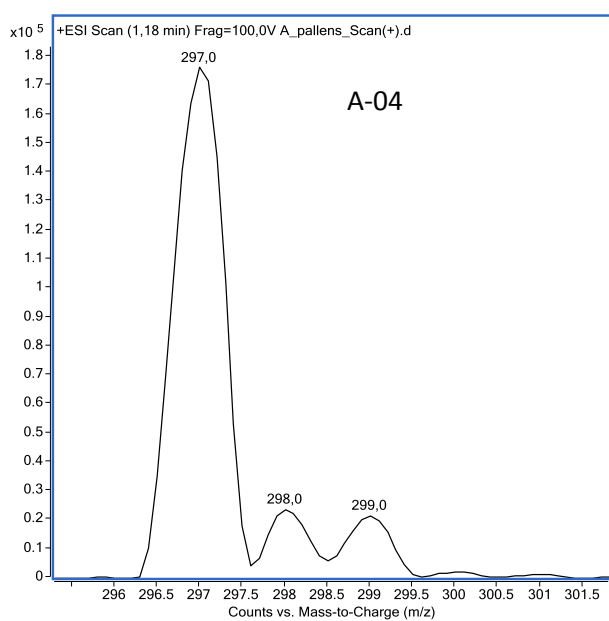
Slika 8.23. (+)ESI BPC hromatogram za uzorak *A. flavum*, Mokra Gora i (+)ESI EIC hromatogrami jona 625, 479 i 317 koji potiču iz tri različita jedinjenja



Slika 8.24. MS² spektri jona 625, 479 i 317 u pozitivnom Product Ion Scan modu za jedinjenje A-34 i A-35



Slika 8.25. Pseudo MS³ spektar jona 317 pri kolizionoj energiji od 35 V i naponu fragmentora od 100-180 V, snimljeni za uzorak *A. flavum* (Babušnica).



Slika 8.26. M+2 izotopski pikovi jona 297 iz jedinjenja A-04 i jona 291 iz jedinjenja A-06

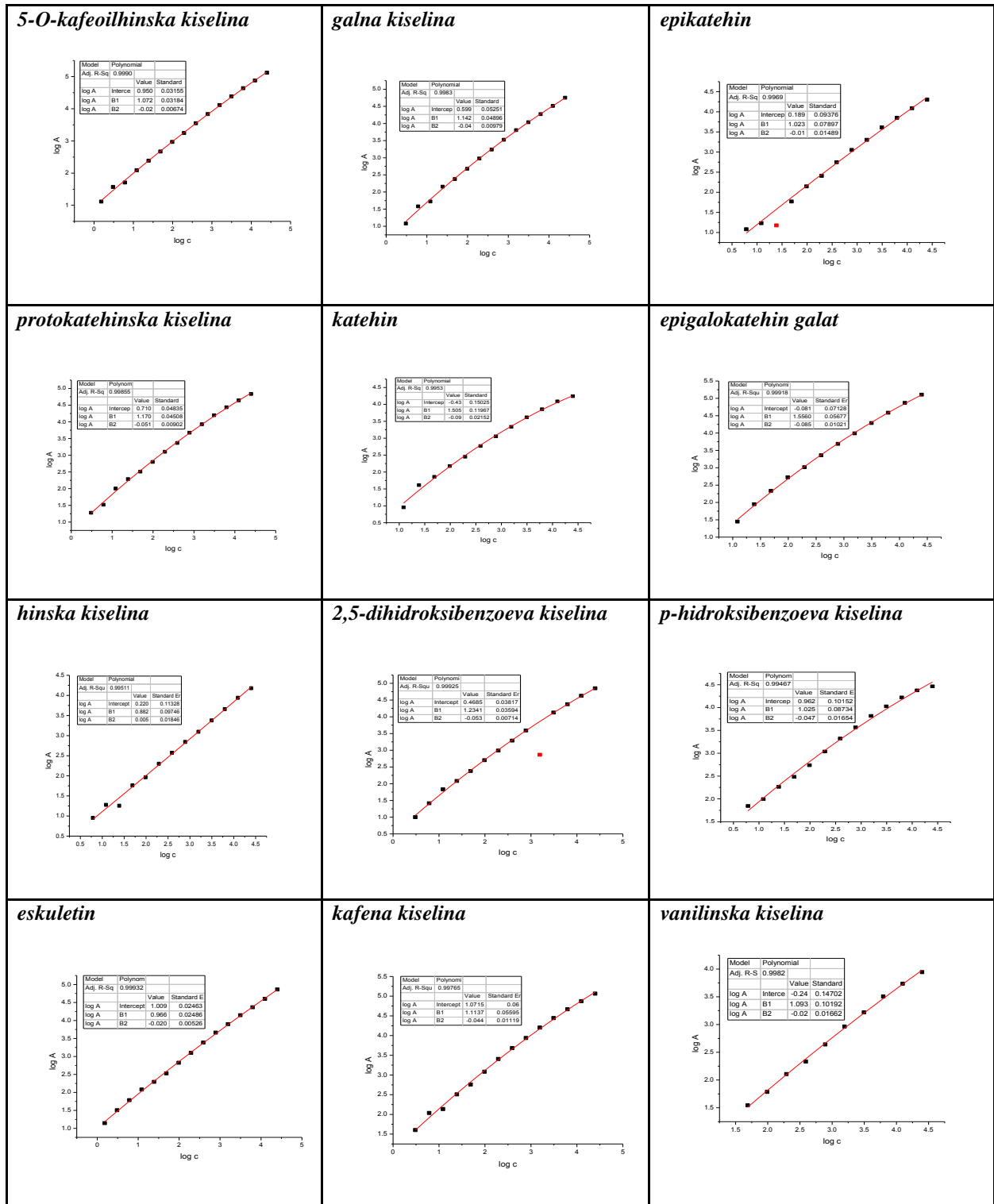
8.4. KVANTITATIVNA ANALIZA ODABRANIH FENOLNIH JEDINJENJA U EKSTRAKTIMA LC-MS/MS METODOM

Tabela 8.4. Površine pikova 45 standardnih jedinjenja u 15 različitim koncentracija, koje su korišćene za konstruisanje kalibracionih krivih

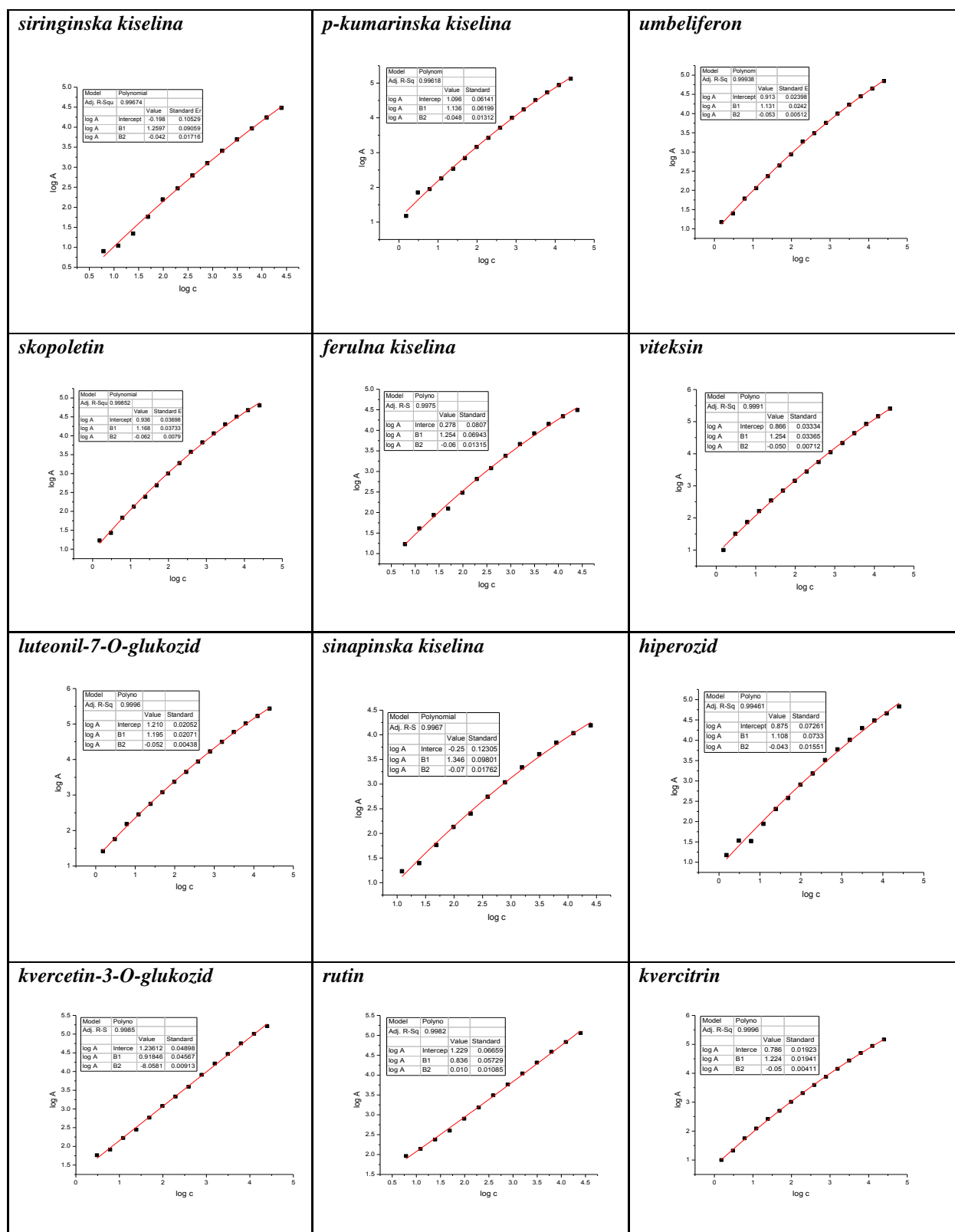
Koncentracija (ng/mL)	24997	12499	6250	3125	1562	781	390	195	97,66	48,83	24,41	12,21	6,10	3,05	1,53
log C	4,398	4,097	3,796	3,495	3,194	2,893	2,592	2,291	1,990	1,689	1,388	1,087	0,786	0,485	0,184
	log A														
<i>galna kiselina</i>	4,750	4,512	4,272	4,037	3,806	3,524	3,241	2,976	2,676	2,377	2,155	1,724	1,580	1,079	/
<i>katehin</i>	4,241	4,089	3,856	3,617	3,336	3,056	2,767	2,452	2,176	1,857	1,613	0,954	/	/	/
<i>protokatehinska k.</i>	4,834	4,642	4,435	4,198	3,929	3,676	3,369	3,105	2,801	2,509	2,286	2,004	1,519	1,279	/
<i>5-O-kafeoilhinska k.</i>	5,120	4,881	4,641	4,385	4,115	3,833	3,551	3,248	2,968	2,672	2,387	2,086	1,708	1,568	1,114
<i>epigalokatehin galat</i>	5,107	4,868	4,586	4,289	3,991	3,690	3,359	3,014	2,723	2,335	1,949	1,447	/	/	/
<i>epikatehin</i>	4,301	4,089	3,853	3,612	3,303	3,052	2,747	2,408	2,146	1,771	1,476	1,230	1,079	/	/
<i>2,5-dihidroksibenzoeva k.</i>	4,854	4,627	4,376	4,126	2,865	3,591	3,289	2,990	2,703	2,382	2,083	1,833	1,415	1,000	/
<i>p-hidroksibenzoeva k.</i>	4,465	4,375	4,221	4,026	3,817	3,566	3,321	3,037	2,737	2,483	2,262	1,996	1,845	/	/
<i>eskuletin</i>	4,862	4,601	4,369	4,147	3,899	3,662	3,386	3,100	2,825	2,530	2,292	2,079	1,785	1,505	1,146
<i>kafena k.</i>	5,064	4,874	4,667	4,444	4,202	3,937	3,682	3,406	3,083	2,758	2,509	2,137	2,037	1,602	/
<i>vanilinska k.</i>	3,944	3,736	3,507	3,220	2,963	2,641	2,332	2,107	1,785	1,544	1,415	/	/	/	/
<i>siringinska k.</i>	4,483	4,244	3,970	3,696	3,412	3,104	2,795	2,474	2,196	1,763	1,342	1,041	0,903	/	/
<i>p-kumarinska k.</i>	5,127	4,942	4,732	4,511	4,240	4,001	3,715	3,426	3,164	2,840	2,535	2,255	1,949	1,851	1,176
<i>umbeliferon</i>	4,847	4,650	4,449	4,230	4,000	3,757	3,488	3,273	2,938	2,648	2,369	2,057	1,785	1,398	1,176
<i>skopoletin</i>	4,803	4,678	4,506	4,304	4,063	3,825	3,574	3,277	3,002	2,688	2,384	2,124	1,833	1,431	1,230
<i>ferulna k.</i>	4,494	4,344	4,155	3,926	3,666	3,380	3,080	2,817	2,481	2,097	1,940	1,613	1,230	/	/
<i>viteksin</i>	5,405	5,169	4,926	4,640	4,333	4,047	3,740	3,443	3,156	2,849	2,542	2,212	1,869	1,505	1,000
<i>sinapinska k.</i>	4,192	4,033	3,841	3,606	3,339	3,035	2,744	2,401	2,130	1,763	1,398	1,230	/	/	/
<i>luteolin-7-O-glukozid</i>	5,435	5,226	5,021	4,776	4,499	4,227	3,943	3,652	3,374	3,079	2,751	2,452	2,182	1,756	1,415
<i>hiperozid</i>	4,833	4,659	4,486	4,299	4,010	3,776	3,512	3,183	2,907	2,582	2,308	1,945	1,519	1,532	1,176
<i>kvercetin-3-O-glukozid</i>	5,211	5,008	4,752	4,469	4,214	3,914	3,594	3,332	3,079	2,767	2,447	2,225	1,914	1,763	1,826
<i>rutin</i>	5,057	4,831	4,584	4,315	4,041	3,762	3,489	3,186	2,903	2,601	2,378	2,143	1,964	1,987	1,969
<i>apiin</i>	5,400	5,189	4,944	4,673	4,409	4,106	3,809	3,529	3,233	2,921	2,647	2,364	2,037	1,602	1,398

Koncentracija (ng/mL)	24997	12499	6250	3125	1562	781	390	195	97,66	48,83	24,41	12,21	6,10	3,05	1,53	
log C	4,398	4,097	3,796	3,495	3,194	2,893	2,592	2,291	1,990	1,689	1,388	1,087	0,786	0,485	0,184	
log A																
<i>o-kumarinska k.</i>	4,997	4,840	4,622	4,383	4,124	3,851	3,578	3,315	3,054	2,680	2,403	2,161	1,771	1,556	/	
<i>miricetin</i>	4,772	4,520	4,260	3,986	3,711	3,399	3,116	2,704	2,360	1,914	1,380	/	/	/	/	
<i>kvercitrin</i>	5,169	4,947	4,701	4,440	4,154	3,880	3,593	3,311	3,012	2,700	2,420	2,090	1,748	1,322	1,000	
<i>kemferol-3-O-glukozid</i>	5,223	5,038	4,819	4,580	4,311	4,041	3,747	3,452	3,170	2,899	2,542	2,218	1,892	1,732	1,362	
<i>apigenin-7-O-glukozid</i>	4,997	4,901	4,812	4,698	4,542	4,354	4,126	3,864	3,602	3,306	3,029	2,749	2,464	2,137	1,869	
<i>sekoizolaricirezinol</i>	4,026	3,832	3,597	3,362	3,106	2,809	2,491	2,207	1,914	1,748	1,279	1,041	/	/	/	
<i>3,4-dimetoksicimeta k.</i>	4,071	3,832	3,556	3,263	2,993	2,671	2,449	2,093	1,820	1,568	1,322	0,778	/	/	/	
<i>bajkalin</i>	5,105	4,870	4,639	4,375	4,093	3,827	3,532	3,214	2,959	2,639	2,301	1,959	1,342	1,342	/	
<i>daidzein</i>	4,541	4,357	4,142	3,939	3,711	3,486	3,258	2,996	2,718	2,462	2,161	1,820	1,362	0,903	/	
<i>matairezinol</i>	3,578	3,432	3,225	2,994	2,741	2,431	2,167	1,778	1,447	1,204	/	/	/	/	/	
<i>kvercetin</i>	4,880	4,650	4,407	4,152	3,892	3,619	3,341	3,042	2,732	2,458	2,083	1,740	1,255	/	/	
<i>naringenin</i>	4,942	4,737	4,503	4,269	4,029	3,774	3,501	3,277	2,927	2,647	2,360	1,978	1,613	1,176	0,954	
<i>cimeta k.</i>	4,036	3,840	3,596	3,333	3,045	2,754	2,465	1,991	1,909	1,644	1,544	/	/	/	/	
<i>luteolin</i>	4,798	4,597	4,389	4,187	3,940	3,695	3,421	3,153	2,878	2,599	2,220	1,945	1,591	1,146	/	
<i>genistein</i>	4,498	4,311	4,104	3,899	3,657	3,428	3,169	2,890	2,598	2,328	1,991	1,613	1,342	/	/	
<i>kemferol</i>	5,729	5,532	5,326	5,102	4,862	4,611	4,331	4,040	3,756	3,450	3,148	2,827	2,489	2,260	1,690	
<i>apigenin*</i>	3,791	3,559	3,316	3,078	2,818	2,559	2,228	1,919	1,532	1,146	/	/	/	/	/	
<i>izoramnetin</i>	5,454	5,238	5,023	4,794	4,573	4,347	4,089	3,817	3,534	3,222	2,931	2,612	2,199	1,909	1,690	
<i>hrizoeriol</i>	5,255	5,106	4,957	4,789	4,625	4,429	4,213	3,979	3,710	3,416	3,135	2,828	2,519	2,182	1,875	
<i>bajkalein</i>	5,618	5,405	5,169	4,927	4,656	4,386	4,113	3,795	3,502	3,177	2,825	2,423	1,969	1,613	/	
<i>amentoflavin</i>	5,473	5,356	5,220	5,071	4,900	4,704	4,473	4,218	3,952	3,679	3,405	3,102	2,827	2,558	2,263	
<i>hinska k.</i>	4,179	3,941	3,658	3,376	3,096	2,843	2,573	2,301	1,964	1,763	1,255	1,279	0,954	/	/	

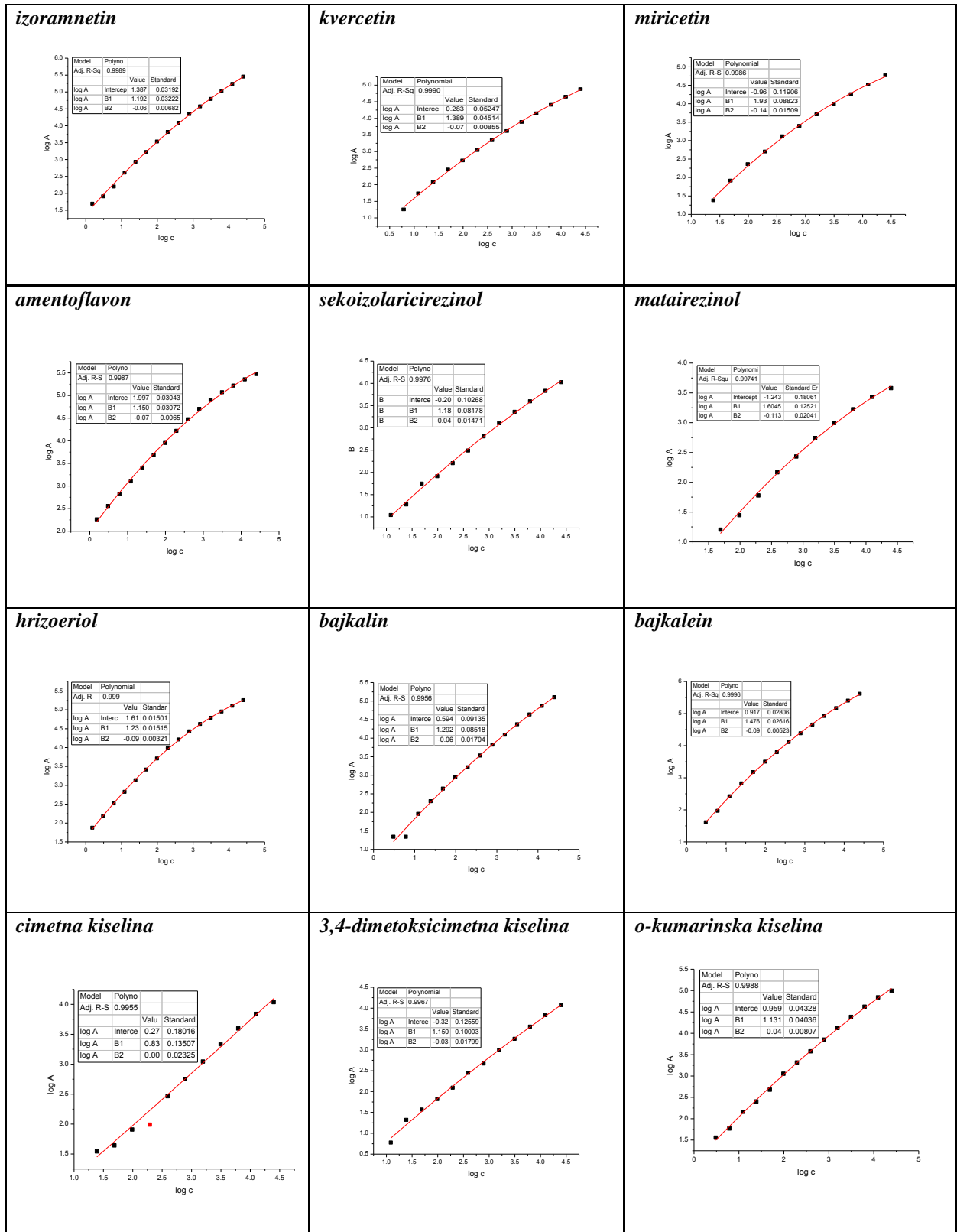
* koncentracije apigenina niže su 10× u odnosu na ostala jedinjenja



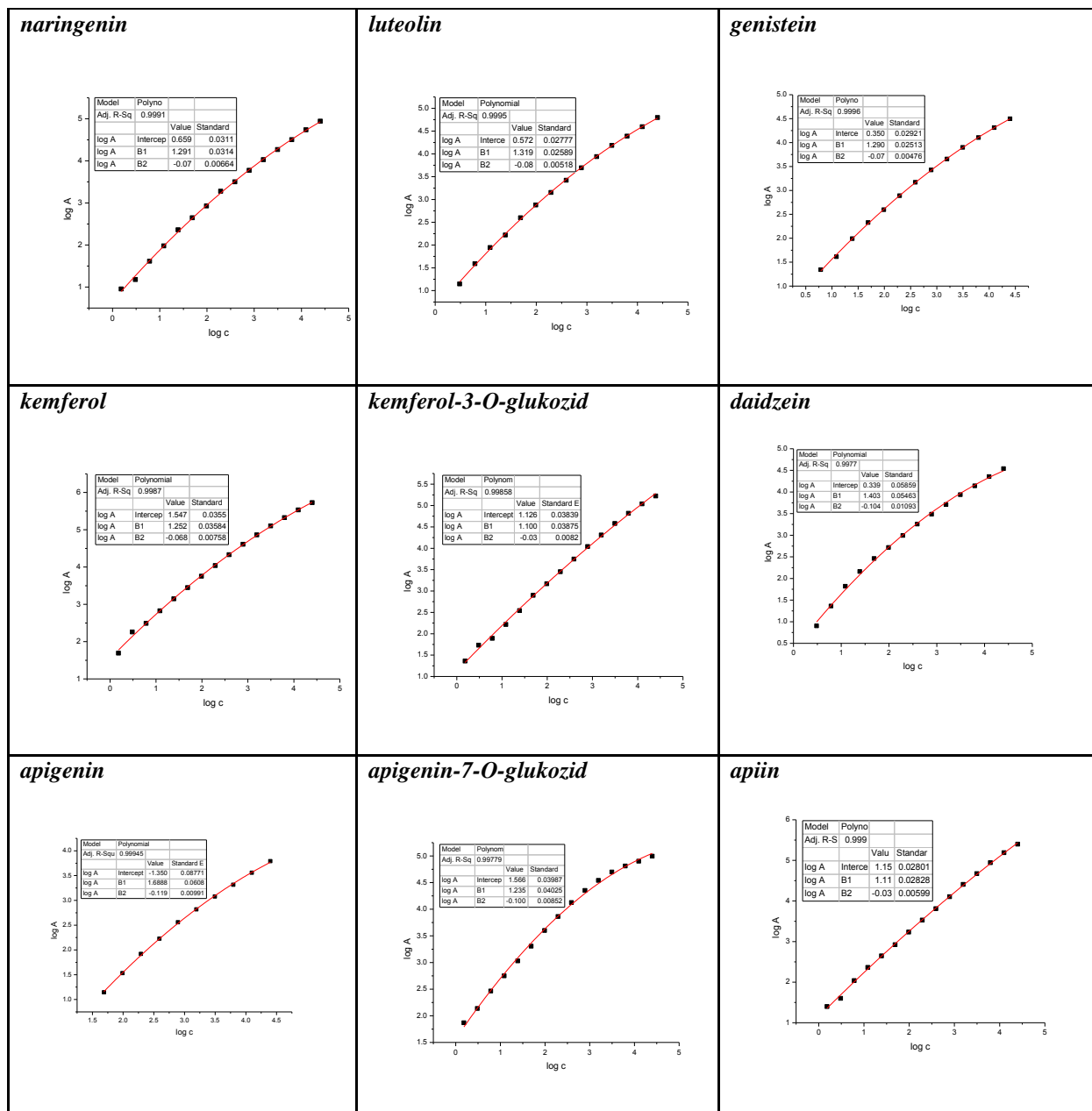
Slika 8.27. Kalibracione krive standardnih jedinjenja



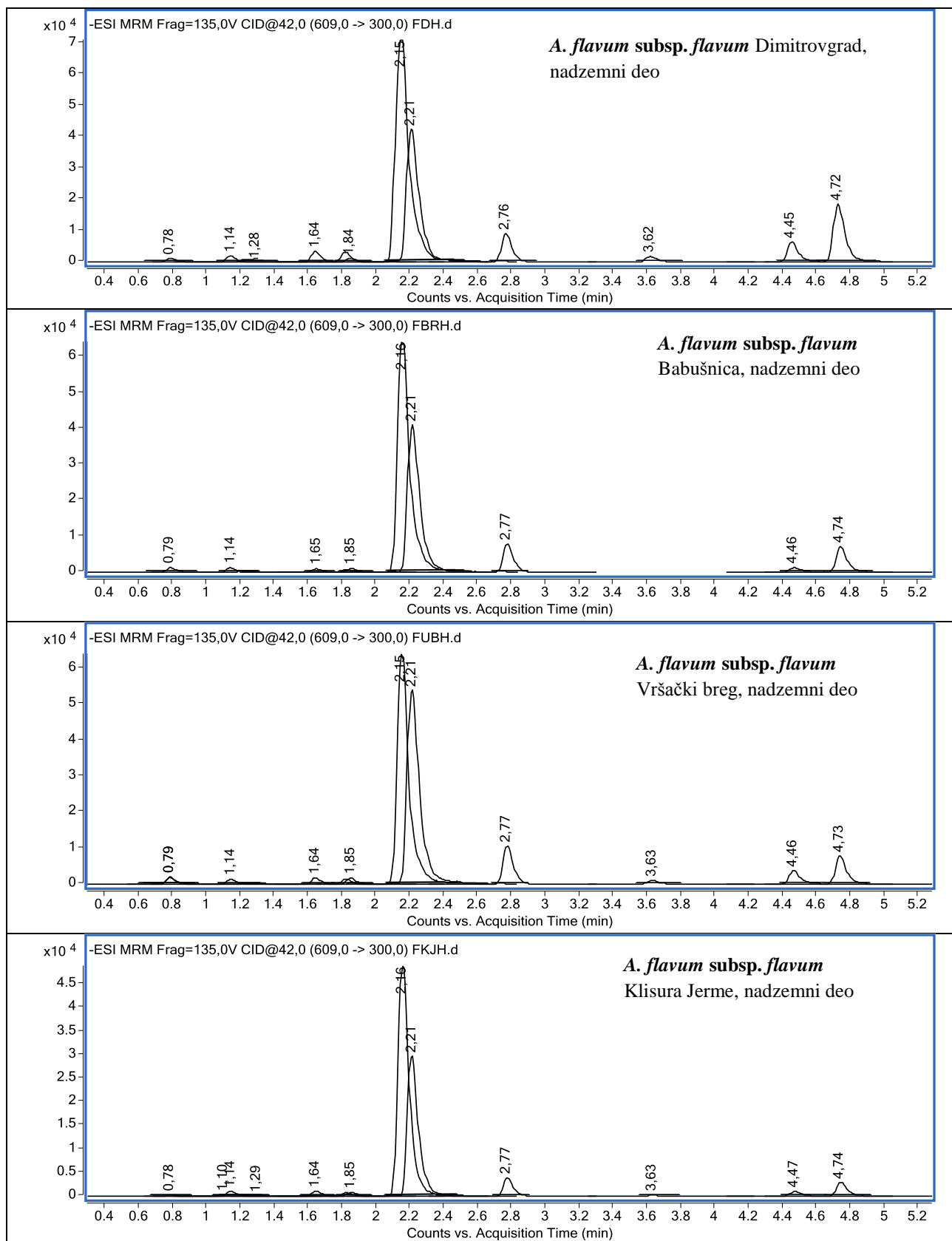
Slika 8.28. Kalibracione krive standardnih jedinjenja



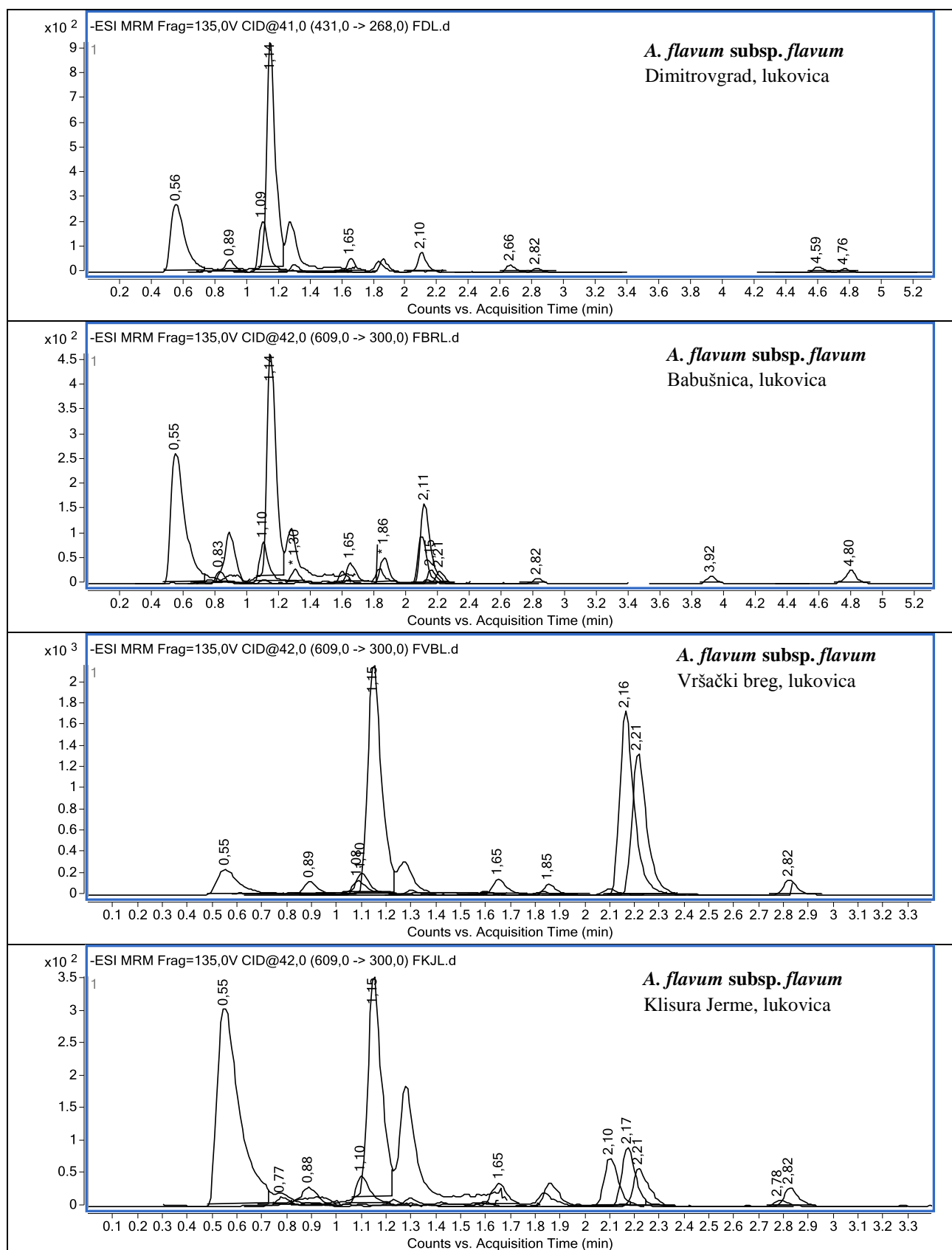
Slika 8.29. Kalibracione krive standardnih jedinjenja

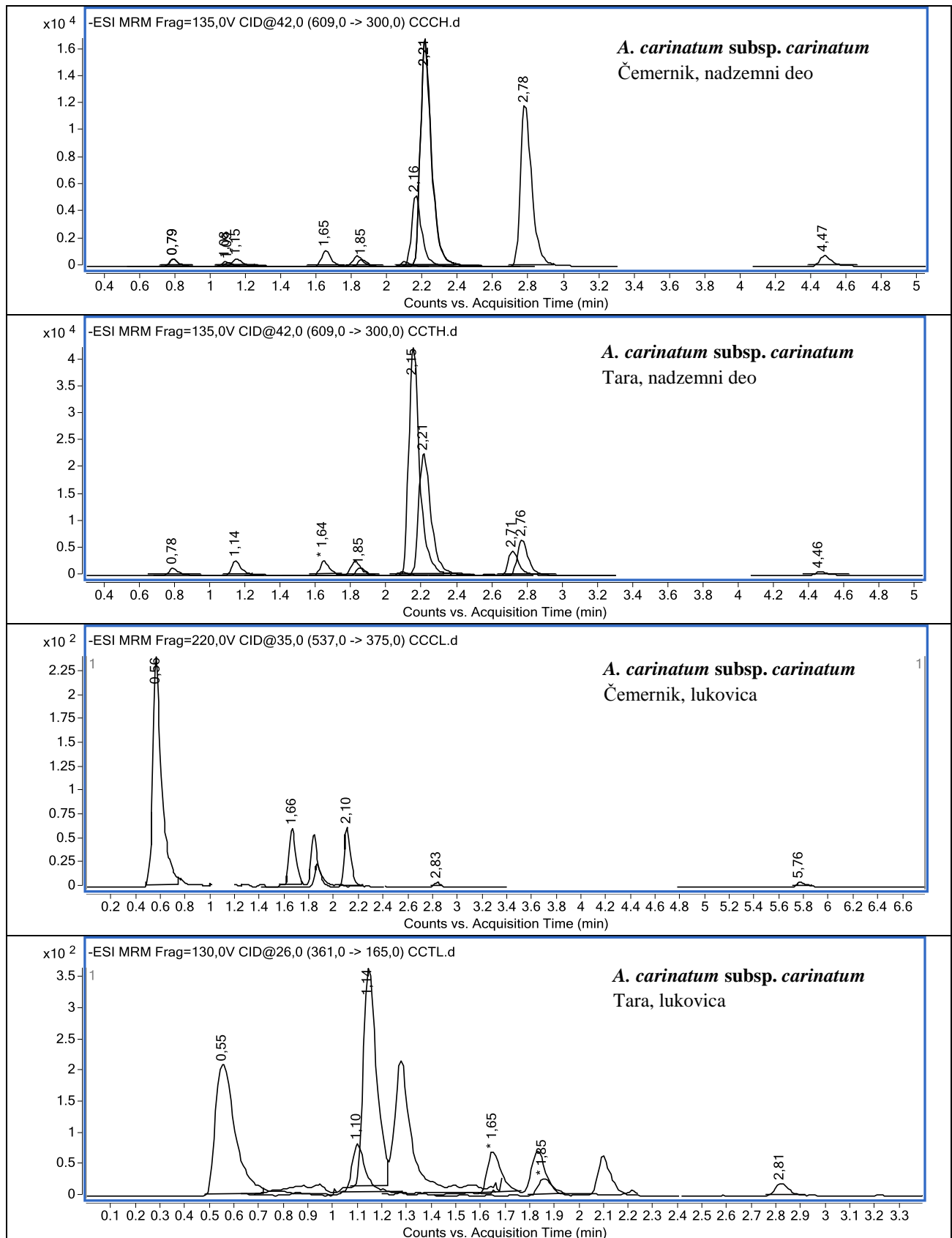


Slika 8.30. Kalibracione krive standardnih jedinjenja

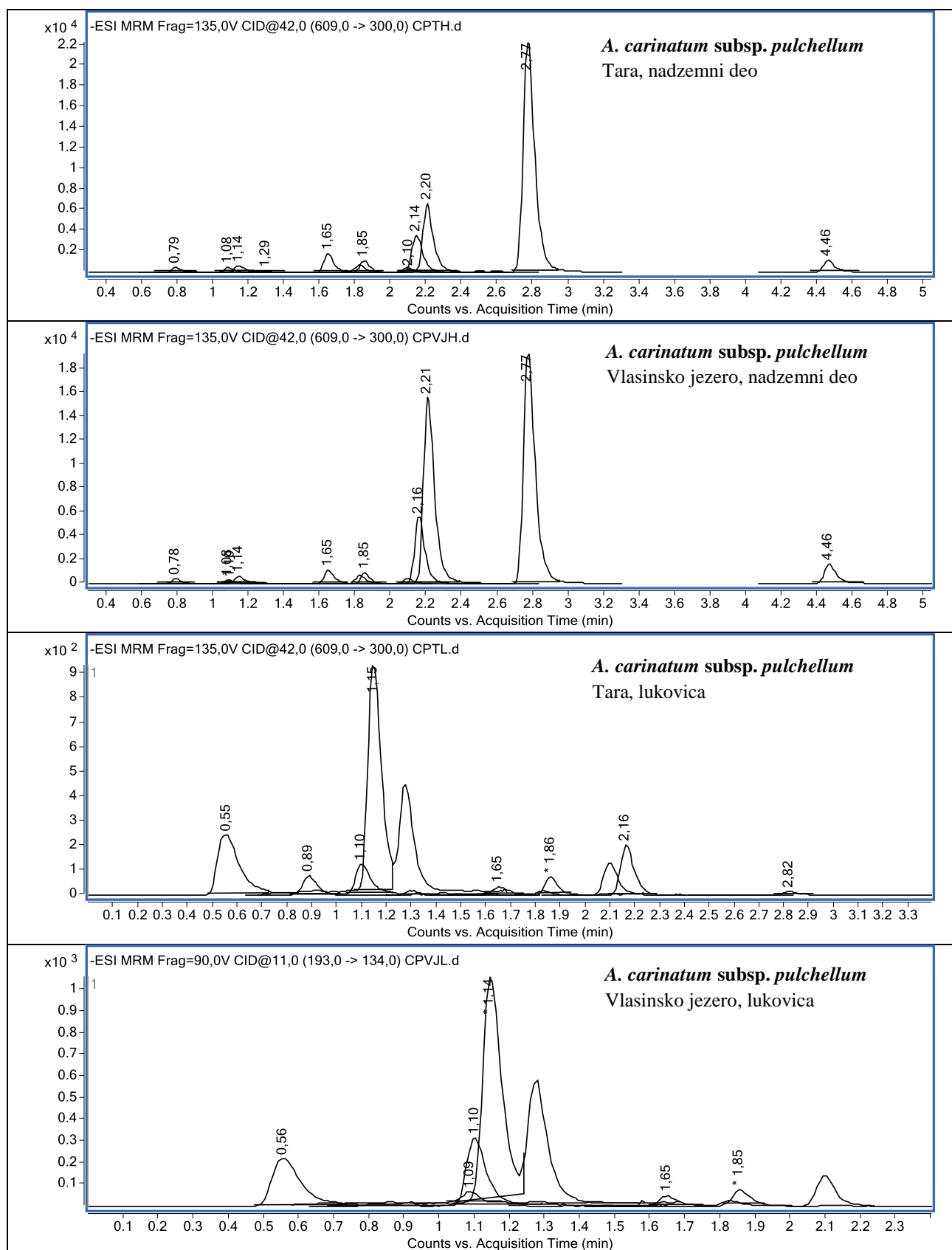


Slika 8.31. (-)ESI MRM hromatogrami ekstrakata nadzemnih delova vrste *A. flavum*

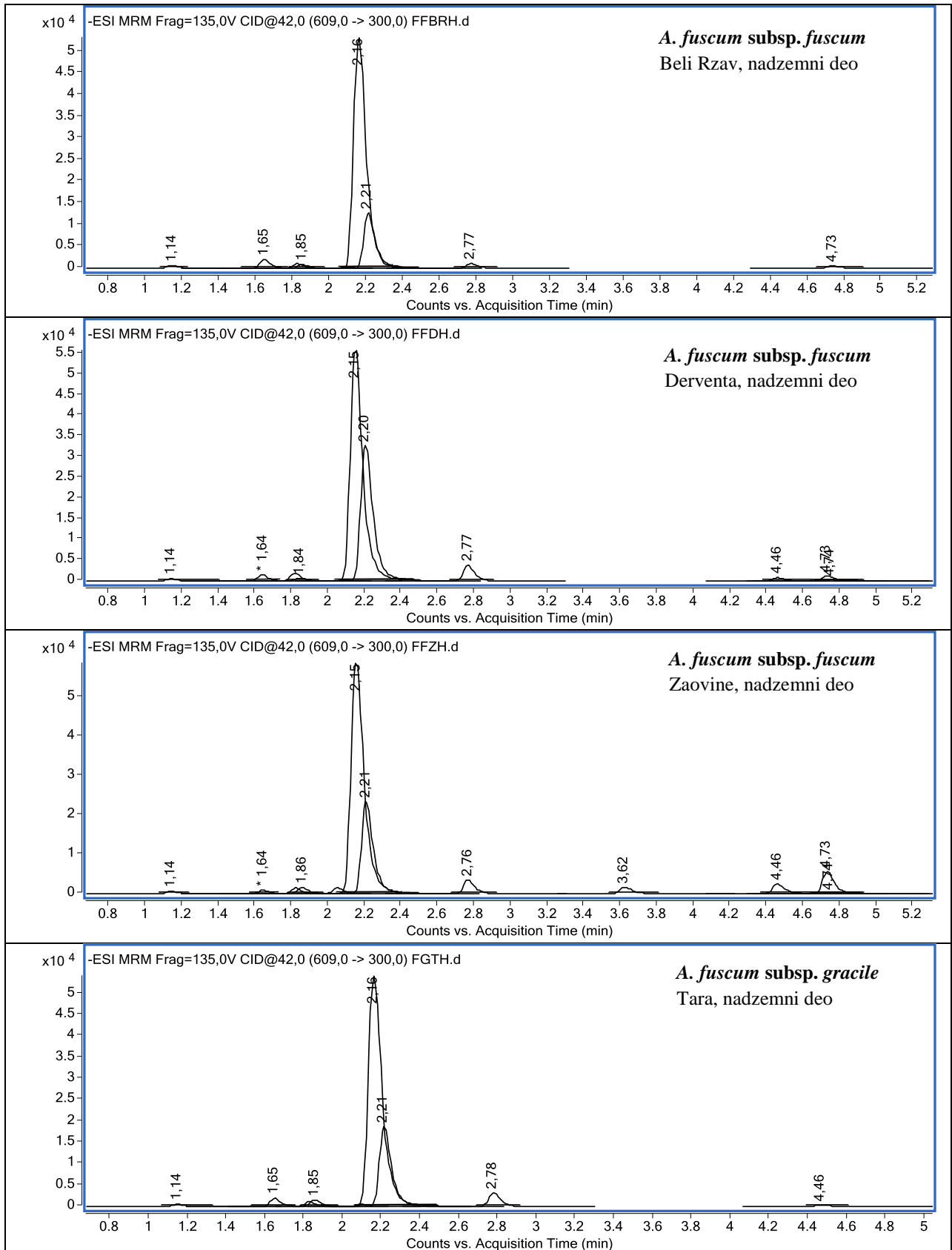
Slika 8.32. (-)ESI MRM hromatogrami ekstrakata lukovica vrste *A. flavum*



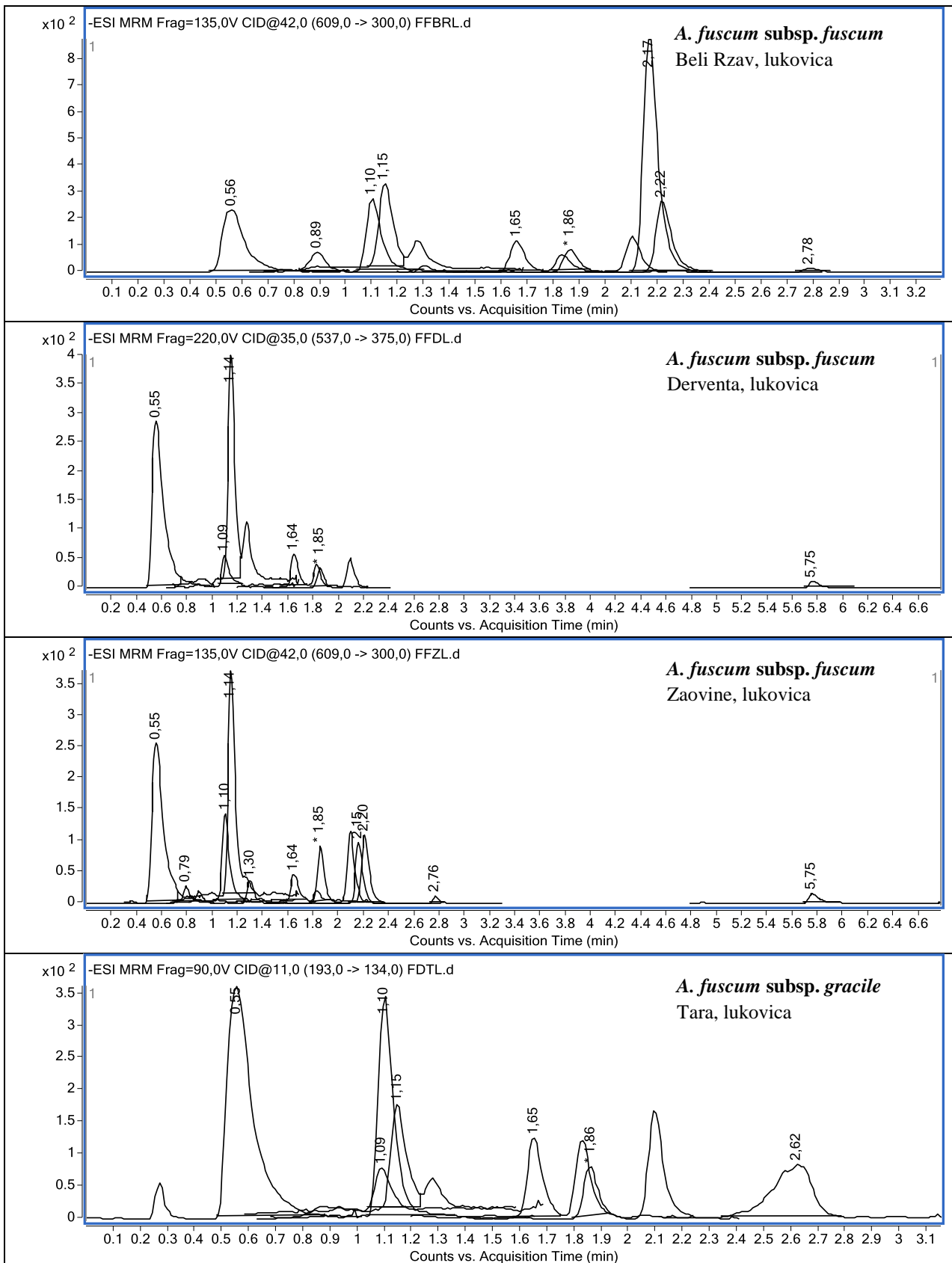
Slika 8.33. (-)ESI MRM hromatogrami ekstrakata nadzemnih delova i lukovica vrste *A. carinatum subsp. carinatum*



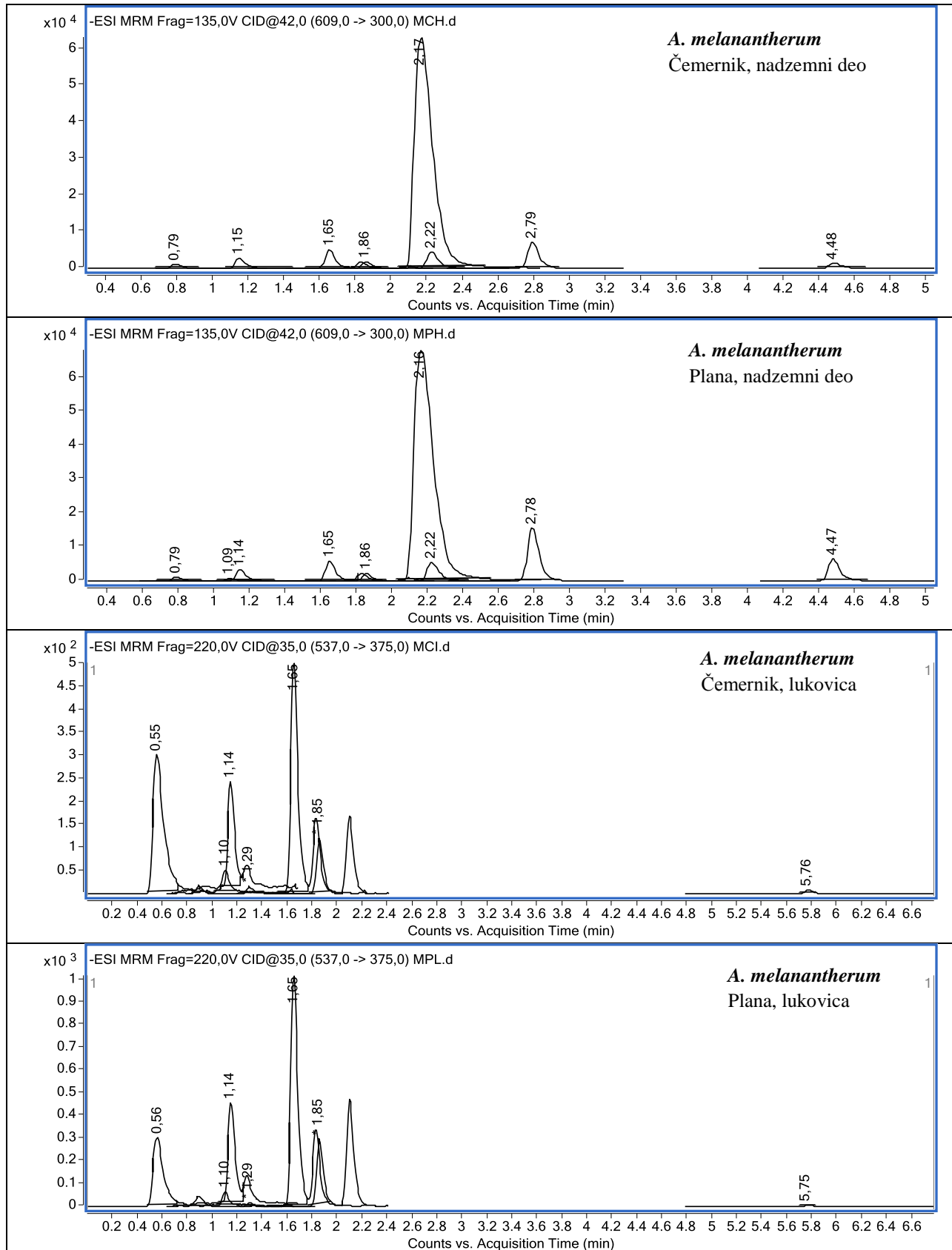
Slika 8.34. (-)ESI MRM hromatogrami ekstrakata nadzemnih delova i lukovica vrste *A. carinatum subsp. pulchellum*



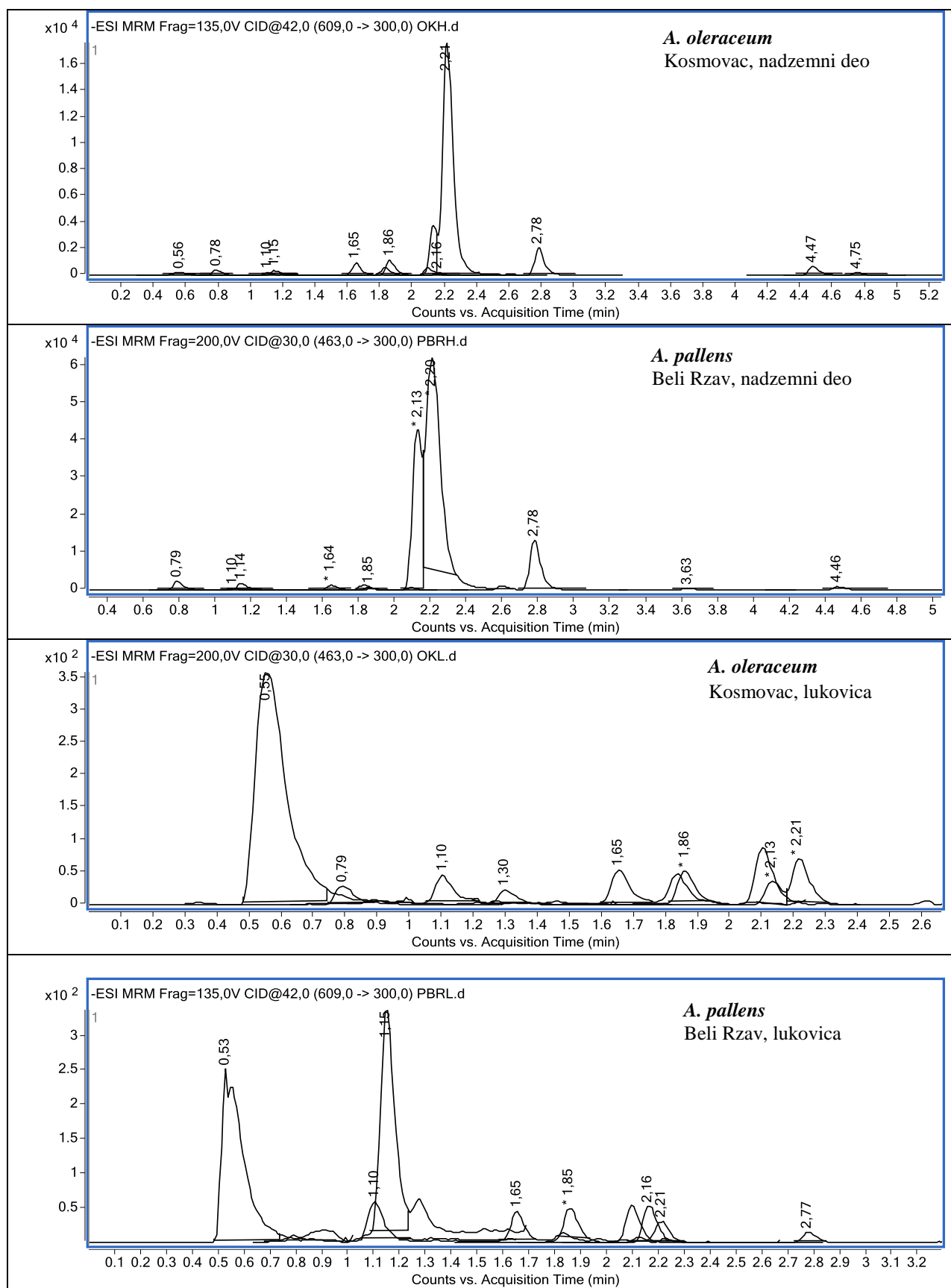
Slika 8.35. (-)ESI MRM hromatogrami ekstrakata nadzemnih delova vrste *A. fuscum*



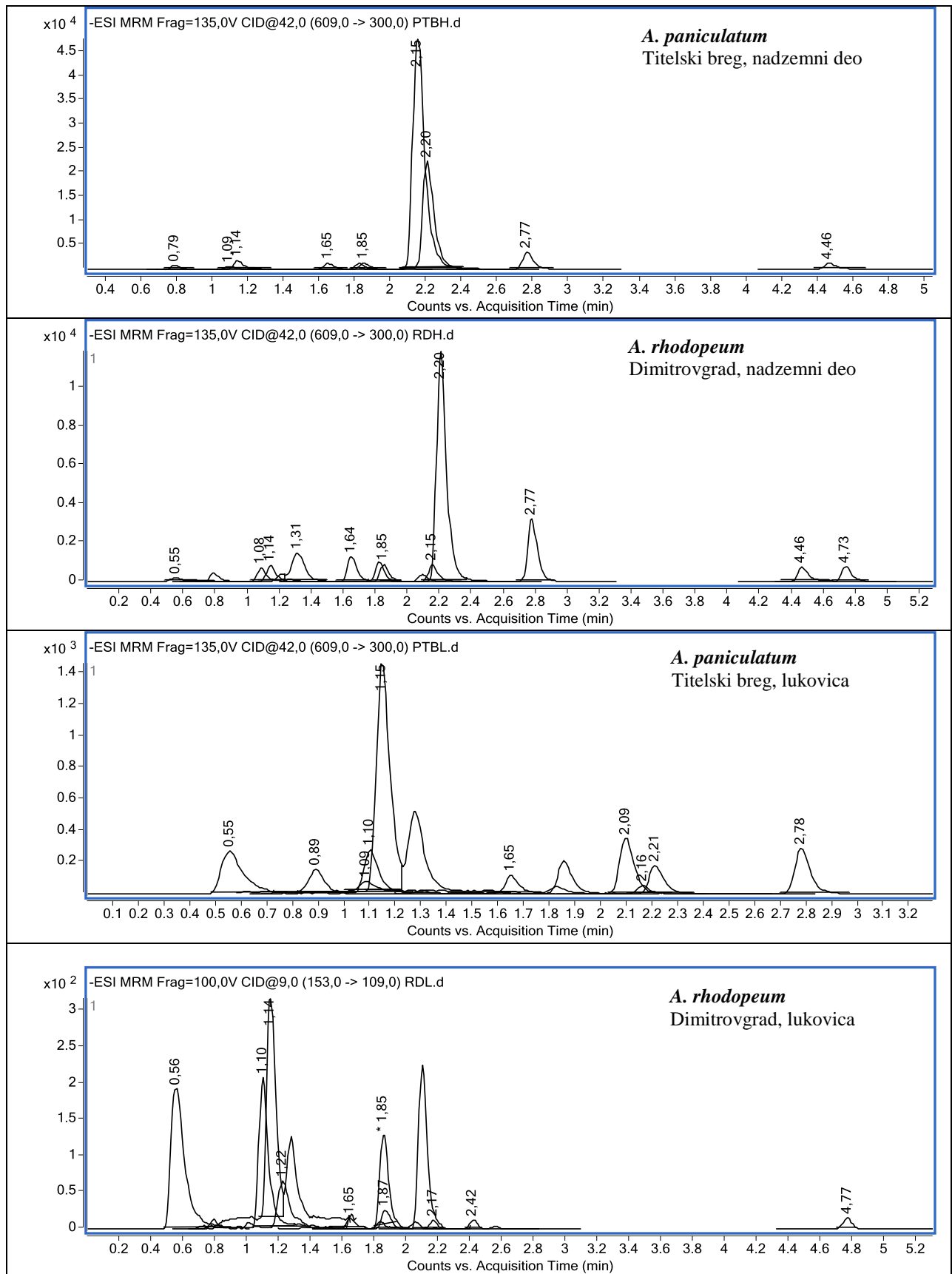
Slika 8.36. (-)ESI MRM hromatogrami ekstraktata lukovica vrste *A. fuscum*



Slika 8.37. (-)ESI MRM hromatogrami ekstrakata nadzemnih delova i lukovica vrste *A. melanatherum*



Slika 8.38. (-)ESI MRM hromatogrami ekstraktata nadzemnih delova i lukovica vrsta *A. pallens* i *A. oleraceum*



Slika 8.39. (-)ESI MRM hromatogrami ekstrakata nadzemnih delova i lukovica vrsta *A. paniculatum* i *A. rhodopeum*

Tabela 8.5. Površine pikova očitane iz (-)ESI MRM hromatograma i koncentracije detektovanih jedinjenja izračunate iz kalibracionih krivih za vrstu *A. flavum* subsp. *flavum* sa različitih lokaliteta

<i>A. flavum</i> subsp. <i>flavum</i>									
lokalitet		Dimitrovgrad		Babušnica		Klisura Jerme		Vršački berg	
deo biljke		nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	PP	3168	627	1318	209	1290	266	2701	449
	ng/ml*	708	93,0	230	26,1	224	34,3	574	62,7
	mg/ml#	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
cimetna kiselina	PP	48,0	/	/	/	39,0	/	17,0	/
	ng/ml	45,7	/	/	/	32,4	/	/	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
2,5-dihidroksi-benzoeva kiselina	PP	352	37,0	/	18,0	160	/	104	22,0
	ng/ml	67,6	8,49	/	4,53	32,0	/	21,5	5,39
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
protokatehinska kiselina	PP	4739	73,0	5193	60,0	1239	47,0	569	159
	ng/ml	804	10,8	893	8,96	182	7,14	80,8	22,6
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	0,20	2,00
<i>p</i> -kumarinska kiselina	PP	13433	230	3718	164	4686	141	6712	587
	ng/ml	1170	14,8	267	10,7	346	9,25	520	37,8
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
vanilinska kiselina	PP	540	84,0	498	34,0	401	16,0	1191	71,0
	ng/ml	931	130	852	40,1	673	/	2234	104
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	/	2,00	2,00
galna kiselina	PP	43,0	/	81,0	/	/	/	96,0	/
	ng/ml	8,71	/	16	/	/	/	18,8	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
eskuletin	PP	3552	842	547	331	943	177	1605	847
	ng/ml	627	119	72,9	41,6	135	20,8	249	120
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
kafena kiselina	PP	8025	3593	5044	1772	4129	1319	5361	8517
	ng/ml	753	300	440	138	351	100	472	807
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
hinska kiselina	PP	1140	1755	906	1637	1190	1904	1042	1564
	ng/ml	1416	2265	1102	2100	1484	2475	1284	1998
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	0,20	2,00
ferulna kiselina	PP	4870	202	4212	206	3375	146	329	390
	ng/ml	1827	59,9	1538	61,1	1186	43,8	97,0	115
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	0,20	2,00
siringinska kiselina	PP	503	114	532	105	488	52,0	1452	166
	ng/ml	329	82,2	347	76,2	320	40,5	925	116
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
sinapinska kiselina	PP	175	/	75	8	87	/	123	13
	ng/ml	137	/	60,7	6,62	69,5	/	97,6	10,6
	mg/ml	2,00	/	2,00	2,00	2,00	/	2,00	2,00
apigenin	PP	20,0	97,0	4,00	11,0	4,00	/	41,0	/
	ng/ml	4,99	26,0	/	/	/	/	10,5	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
kemferol	PP	29806	18,0	5880	/	4653	/	18102	132
	ng/ml	560	/	97,6	/	77,0	/	320,5	2,95
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
luteolin	PP	45,0	/	20,0	63,0	8,00	/	67,0	/
	ng/ml	7,50	/	3,79	9,96	/	/	10,5	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
hrizoeriol	PP	1657	61,0	2839	134	470	7,00	2001	16,0
	ng/ml	28,7	/	50,8	2,67	8,28	/	34,9	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
kvercetin	PP	8197	/	2193	/	983	/	5028	57,0
	ng/ml	1575	/	382	/	172	/	915	13,6
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
izoramnetin	PP	90571	/	31817	7,00	13732	34,0	35605	341
	ng/ml	4936	/	1323	/	459	/	1524	10,3
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
5-O-kafeoilhinska kiselina	PP	136	26,0	24,0	94,0	17,0	18,0	267	19,0
	ng/ml	14,0	2,71	2,50	9,69	1,78	1,88	27,3	1,99
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
sekoizolaricirezinol	PP	80,0	62,0	30,0	48,0	50,0	119	329	564
	ng/ml	92,3	71,0	33,6	54,5	56,9	139	396	689
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
viteksin	PP	71,0	/	50,0	/	10,0	/	214	/
	ng/ml	6,54	/	4,89	/	1,29	/	16,3	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00

<i>A. flavum</i> subsp. <i>flavum</i>									
lokalitet		Dimitrovgrad		Babušnica		Klisura Jerme		Vršački berg	
deo biljke		nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica
<i>kemferol-3-O-Glc</i>	PP	39076	23,0	34036	20,0	16308	37,0	46072	379
	ng/ml	3303	1,53	2839	1,33	1267	2,47	3957	25,6
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>luteolin-7-O-Glc</i>	PP	65,0	11,0	49,0	718	87,0	/	34,0	/
	ng/ml	3,29	/	2,55	29,3	4,30	/	1,83	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>izokvercitrin</i> (<i>kvercetin-3-O-Glc</i>)	PP	60255	6,00	99256	93,0	145942	287	31908	5587
	ng/ml	7152	/	12941	6,28	20460	21,6	3476	558
	mg/ml	0,13	2,00	0,40	2,00	2,00	2,00	0,20	2,00
<i>rutin</i>	PP	117846	12,0	144685	106	230039	355	29236	7148
	ng/ml	25232	/	32383	9,00	56913	35,3	4632	1053
	mg/ml	0,13	2,00	0,40	2,00	2,00	2,00	0,20	2,00

PP – površina pika, * – očitana koncentracija sa kalibracione krive, # – početna koncentracija ekstrakta, Glc – glukozil

Tabela 8.6. Površine pikova očitane iz (-)ESI MRM hromatograma i koncentracije detektovanih jedinjenja izračunate iz kalibracionih krivih za dve podvrste *A. carinatum* sa različitih lokaliteta

<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i>									
lokalitet		Čemernik		Tara		Tara		Vlasinsko jezero	
deo biljke		nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica
<i>p-hidroksibenzojeva kiselina</i>	PP	1243	68,0	1071	20	1771	114	1086	174
	ng/ml*	213	7,67	178	/	333	13,4	181	21,3
	mg/ml#	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>cimetna kiselina</i>	PP	33	/	/	/	43	/	/	/
	ng/ml	29,4	/	/	/	39,8	/	/	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>protokatehinska kiselina</i>	PP	1943	36	5374	13	1815	24	1683	32
	ng/ml	296	5,59	929	/	275	3,87	253	5,02
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>p-kumarinska kiselina</i>	PP	4546	234	10908	286	7142	140	4566	180
	ng/ml	337	15,1	920	18,5	553	9,26	337	11,8
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>vanilinska kiselina</i>	PP	114	/	186	8	162	/	117	19
	ng/ml	177	/	296	/	256	/	182	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>galna kiselina</i>	PP	/	/	43	/	19	/	35	/
	ng/ml	/	/	8,71	/	4,06	/	7,17	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>eskuletin</i>	PP	1001	20	2193	315	312	530	803	1335
	ng/ml	145	/	357	39,4	38,9	70,4	113	201
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>kafena kiselina</i>	PP	2151	/	10544	1353	2383	3593	2466	4150
	ng/ml	170	/	1038	103	190	300	197	353
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>hinska kiselina</i>	PP	839	1200	1339	1185	903	1519	618	1312
	ng/ml	1014	1498	1688	1477	1098	1936	726	1650
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>ferulna kiselina</i>	PP	1909	89	5634	108	4359	286	3428	295
	ng/ml	620	27,4	2177	32,9	1602	84,4	1208	87,0
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>siringinska kiselina</i>	PP	210	12	313	38	443	70	119	20
	ng/ml	144	11,3	210	30,6	291	52,8	85,4	17,5
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>sinapsinska kiselina</i>	PP	10	/	53	/	100	19	35	8
	ng/ml	/	/	40,7	/	72,7	16,5	28,1	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>apigenin</i>	PP	18	/	8	/	9	/	38	/
	ng/ml	4,42	/	/	/	/	/	9,33	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>kemferol</i>	PP	3827	0	3401	0	5314	9	7995	/
	ng/ml	63,4	1,00	56,4	1,00	88,1	1,00	134	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>luteolin</i>	PP	38	/	36	/	35	/	38	/
	ng/ml	6,36	/	6,08	/	5,94	/	6,36	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00

lokalitet	<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i>				<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchellum</i>				
	Čemernik		Tara		Tara		Vlasinsko jezero		
	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	
deo biljke	PP	238	/	340	/	71	/	230	/
<i>hrizoeriol</i>	ng/ml	4,44	/	6,13	/	1,56	/	4,30	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
	PP	84	/	763	/	34	/	79	/
<i>kvercetin</i>	ng/ml	18,8	/	1354	/	8,91	/	17,8	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
	PP	39	/	73	/	102	/	11	/
<i>5-O-kafeoilhinska kiselina</i>	ng/ml	4,04	/	7,41	/	10,3	/	/	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
	PP	48	16	77	79	30	60	46	29
<i>sekoizolaricirezinol</i>	ng/ml	52,5	18,2	83,9	86,1	33,2	65,4	50,3	32,1
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
	PP	53819	8	28925	/	103747	33	91197	10
<i>kemferol-3-O-Glc</i>	ng/ml	5249	/	2526	/	11627	2,30	9927	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
	PP	77	4	93	/	1153	5	35	/
<i>luteolin-7-O-Glc</i>	ng/ml	3,80	/	4,50	/	46,9	/	1,92	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
	PP	73289	/	114953	/	27242	19	68879	22
<i>izokvercitrin (kvercetin-3-O-Glc)</i>	ng/ml	8962	/	14636	/	3049	/	8377	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
	PP	228	/	101	/	43	/	192	/
<i>apiin</i>	ng/ml	13,1	/	6,04	/	2,73	/	11,1	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
	PP	21201	9	6846	6	15721	797	23050	60
<i>rutin</i>	ng/ml	3505	/	1005	/	2522	89,4	3841	/
	mg/ml	2,00	2,00	0,20	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00

PP – površina pika, * – očitana koncentracija sa kalibracione krive, # – početna koncentracija ekstrakta, Glc – glukozil, Rha – ramnozil

Tabela 8.7. Površine pikova očitane iz (-)ESI MRM hromatograma i koncentracije detektovanih jedinjenja izračunate iz kalibracionih krivih za dve podvrste vrste *A. fuscum*

lokalitet	<i>A. fuscum</i> subsp. <i>fuscum</i>				<i>A. fuscum</i> subsp. <i>gracile</i>				
	Beli Rzav		Derventa		Zaovine		Tara		
	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	
deo biljke	PP	648	60	1271	45	742	81	1756	252
<i>p-hidroksibenzoeva kiselina</i>	ng/ml*	96,7	6,72	220	/	114	9,25	330	32,3
	mg/ml#	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
	PP	1798	59	1502	21	1459	97	1754	26
<i>protokatehinska kiselina</i>	ng/ml	272	8,82	224	3,43	217	14,08	265	4,16
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
	PP	/	/	/	/	8	/	/	850
<i>o-kumarinska kiselina</i>	ng/ml	/	/	/	/	/	/	/	76,8
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	/	2,00
	PP	8315	467	6218	228	3651	184	7711	510
<i>p-kumarinska kiselina</i>	ng/ml	666	30,0	472	14,8	261	11,8	610	32,8
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
	PP	134	16	139	28	102	24	192	9
<i>vanilinska kiselina</i>	ng/ml	209	/	218	/	158	/	306	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
	PP	39	/	26	/	78	/	8	/
<i>galna kiselina</i>	ng/ml	7,94	/	5,43	/	15,4	/	/	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
	PP	624	1125	480	204	779	585	872	1414
<i>eskuletin</i>	ng/ml	84,6	165	63,0	24,3	109	79	124	215
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
	PP	2510	1242	2205	1485	2646	1354	2079	664
<i>kafena kiselina</i>	ng/ml	201	93,9	175	114	213	103	164	48,6
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
	PP	643	1473	1432	1863	1761	1630	1131	2409
<i>hinska kiselina</i>	ng/ml	758	1872	1815	2417	2274	2090	1404	3196
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
	PP	3475	331	2977	130	1874	357	6361	329
<i>ferulna kiselina</i>	ng/ml	1227	97,6	1026	39,2	607	105	2524	97,0
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
	PP	348	87	156	28	103	143	203	61
<i>siringinska kiselina</i>	ng/ml	232	64,3	109	23,4	74,9	101	140	46,7
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00

lokalitet deo biljke		<i>A. fuscum</i> subsp. <i>fuscum</i>				<i>A. fuscum</i> subsp. <i>gracile</i>			
		Beli Rzav		Derвента		Zaovine		Tara	
		nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica
<i>sinapinska kiselina</i>	PP	254	8	72	17	185	13	29	/
	ng/ml	177	/	53,7	15,0	130	/	23,8	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>kemferol</i>	PP	1872	/	3787	/	12263	37	1499	0
	ng/ml	31,6	/	62,7	/	210	/	25,6	1,00
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>luteolin</i>	PP	59	/	24	/	57	/	14	/
	ng/ml	9,25	/	4,34	/	8,98	/	/	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>hrizoeriol</i>	PP	417	/	876	/	648	35	233	/
	ng/ml	7,41	/	15,1	/	11,2	/	4,35	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>kvercetin</i>	PP	421	/	1074	6	8250	21	301	/
	ng/ml	77,4	/	187	/	1587	/	/	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>izoramnetin</i>	PP	2578	16	6111	/	26637	15	426	/
	ng/ml	75,4	/	189	/	1029	/	57,1	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>sekoizolaricirezinol</i>	PP	12	36	8	3	/	21	14	29
	ng/ml	13,9	39,6	/	/	/	23,6	16,1	32,1
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>viteksin</i>	PP	62	9	51	/	6673	/	14	10
	ng/ml	5,77	/	4,89	/	435	/	/	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>kemferol-3-O-Glc</i>	PP	4572	60	16613	12	15690	36	13988	/
	ng/ml	319	4,02	1335	/	1251	2,49	1099	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	/	2,00	2,00	2,00	/
<i>luteolin-7-O-Glc</i>	PP	116	/	71	7	88	12	32	/
	ng/ml	5,47	/	3,54	/	4,28	/	1,78	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>izokvercitrin (kvercetin-3-O-Glc)</i>	PP	54795	1048	8275	27	4254	519	83707	/
	ng/ml	6528	87,7	833	/	403	40,8	10360	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>rutin</i>	PP	79319	3648	13328	2	14297	396	274137	9
	ng/ml	14762	498	2103	/	2271	40,1	61376	/
	mg/ml	0,40	2,00	0,20	2,00	0,20	2,00	2,00	2,00

PP – površina pika, * – očitana koncentracija sa kalibracione krive, # – početna koncentracija ekstrakta, Glc –glukozil, Rha – ramnozil.

Tabela 8.8. Površine pikova očitane iz (-)ESI MRM hromatograma i koncentracije detektovanih jedinjenja izračunate iz kalibracionih krivih za vrste *A. oleraceum*, *A. pallens*, *A. paniculatum* i *A. rhodopeum*

lokalitet deo biljke		<i>A. oleraceum</i>		<i>A. pallens</i>		<i>A. paniculatum</i>		<i>A. rhodopeum</i>	
		Kosmovac		Beli Rzav		Titelski breg		Dimitrovgrad	
		nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica
<i>p-hidroksibenzojeva kiselina</i>	PP	790	95	2901	166	2385	254	2699	224
	ng/ml*	123	11,0	631	20,2	488	32,5	574	28,2
	mg/ml#	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>2,5-dihidroksibenzojeva kiselina</i>	PP	/	/	/	/	112	16	/	20
	ng/ml	/	/	/	/	23,0	4,06	/	4,95
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>protokatehinska kiselina</i>	PP	1429	118	8899	46	2985	91	1817	26
	ng/ml	212	17,0	1681	7,00	476	13,2	275	4,16
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>p-kumarinska kiselina</i>	PP	3543	219	5194	156	5337	439	5299	54
	ng/ml	254	14,1	393	10,1	404	28,0	393	3,73
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>vanilinska kiselina</i>	PP	155	20	521	21	225	38	582	10
	ng/ml	244	/	895	/	362	57,2	1010	1,00
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>galna kiselina</i>	PP	29	/	106	/	53	/	21	/
	ng/ml	6,01	/	20,7	/	10,6	/	4,46	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>eskuletin</i>	PP	654	160	1282	224	2341	1134	661	879
	ng/ml	89,2	18,6	192	27,0	385	167	90,3	125
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>kafena kiselina</i>	PP	1334	159	7361	1275	6788	5541	3217	1224
	ng/ml	101	11,5	680	96,6	619	490	265	92,4
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00

lokalitet deo biljke		<i>A. oleraceum</i>		<i>A. pallens</i>		<i>A. paniculatum</i>		<i>A. rhodopeum</i>	
		Kosmovac		Beli Rzav		Titelski breg		Dimitrovgrad	
		nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica
<i>hinska kiselina</i>	PP	1328	2444	739	1451	1036	1648	1112	1201
	ng/ml	1672	3247	882	1842	1276	2116	1378	1499
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>ferulna kiselina</i>	PP	4622	207	2609	211	5128	839	3535	514
	ng/ml	1717	61,4	882	62,5	1944	254	1252	152
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>siringinska kiselina</i>	PP	277	91	251	14	425	92	337	9
	ng/ml	187	66,9	170	12,8	280	67,6	225	8,81
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>sinapinska kiselina</i>	PP	36	10	52	/	46	15	136	5
	ng/ml	28,8	/	40,0	/	35,8	13,5	97,1	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>kemferol</i>	PP	2983	24	3820	/	6055	88	3471	0
	ng/ml	49,6	/	63,2	/	101	2,10	57,52	1,00
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>hrizoeriol</i>	PP	270	/	731	/	338	13	765	58
	ng/ml	4,97	/	12,63	/	6,10	/	13,20	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>kvercetin</i>	PP	370	21	1722	/	283	/	188	/
	ng/ml	68,8	/	299	/	54,0	/	37,6	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>izoramnetin</i>	PP	932	/	1858	/	549	/	3468	/
	ng/ml	27,0	/	53,8	/	16,2	/	103	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>hlorogenska kiselina</i>	PP	26	/	40	/	340	/	65	/
	ng/ml	2,74	/	4,14	/	34,2	/	6,62	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>sekoizolaricirezinol</i>	PP	39	8	45	9	8	13	16	15
	ng/ml	42,8	/	49,2	/	/	15,0	18,2	17,1
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>viteksin</i>	PP	/	/	/	/	22	/	289	99
	ng/ml	/	/	/	/	2,43	/	22,0	8,61
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>kemferol-3-O-Glc</i>	PP	9063	32	58152	54	15060	1216	13768	/
	ng/ml	676	2,23	5760	3,64	1195	78,6	1080	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>luteolin-7-O-Glc</i>	PP	45	/	175	/	62	/	46	/
	ng/ml	2,38	/	7,93	/	3,15	/	2,43	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>hiperozid (kvercetin-3-O-Gal)</i>	PP	11974	124	9734	23	/	/	/	/
	ng/ml	2084	14,1	1622	2,79	/	/	/	/
	mg/ml	2,00	2,00	0,20	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>izokvercitrin (kvercetin-3-O-Glc)</i>	PP	81574	275	27363	139	106868	709	50708	/
	ng/ml	10074	20,4	3064	9,72	13517	57,3	6000	/
	mg/ml	2,00	2,00	0,2	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>rutin</i>	PP	695	29,0	488	211	231422	190	3621	35
	ng/ml	76,5	/	51,0	19,4	50747	17,2	494	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00

PP – površina pika, * – očitana koncentracija sa kalibracione krive, # – početna koncentracija ekstrakta, Glc – glukozil, Rha – ramnozil, Gal – galaktozil

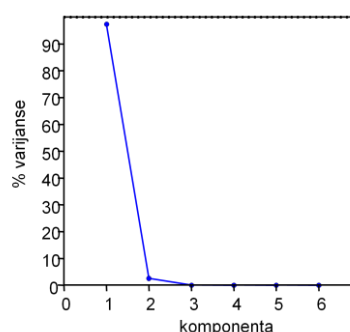
Tabela 8.9. Površine pikova očitane iz (-)ESI MRM hromatograma i koncentracije detektovanih jedinjenja izračunate iz kalibracionih krivih za vrstu *A. melanatherum*

lokalitet deo biljke		<i>A. melanatherum</i>					
		Čemernik			Plana		Plana livada
		nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	nadzemni	
<i>p-hidroksibenzoeva kiselina</i>	PP	1442	105	2339	132	2373	
	ng/ml*	257	12,2	476	15,7	485	
	mg/ml#	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	
<i>cimetna kiselina</i>	PP	53	/	89	/	28	
	ng/ml	50,8	/	92,7	/	/	
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	
<i>protokatehinska kiselina</i>	PP	4553	22	4919	22	3773	
	ng/ml	768	3,58	839	3,58	619	
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	

<i>A. melanatherum</i>						
lokalitet		Čemernik		Plana		Plana livada
deo biljke		nadzemni	lukovica	nadzemni	lukovica	nadzemni
<i>p-kumarinska kiselina</i>	PP	19874	2002	23477	4033	49962
	ng/ml	1884	136	2296	296	6000
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>vanilinska kiselina</i>	PP	224	22	491	9	308
	ng/ml	360	/	839	/	506
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>galna kiselina</i>	PP	45	/	65	/	201
	ng/ml	9,09	/	12,91	/	39,1
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>eskuletin</i>	PP	2018	193	2884	230	4265
	ng/ml	324	22,9	491	27,8	778
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>kafena kiselina</i>	PP	11318	866	14030	1752	25311
	ng/ml	1129	64,1	1460	136	3009
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>hinska kiselina</i>	PP	1106	1823	1183	1786	1522
	ng/ml	1370	2361	1474	2309	1940
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>ferulna kiselina</i>	PP	7273	478	8576	1178	14647
	ng/ml	2975	141	3653	365	7264
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>siringinska kiselina</i>	PP	418	53	640	54	796
	ng/ml	276	41,2	415	41,9	512
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>sinapinska kiselina</i>	PP	30	7	21	0	23
	ng/ml	24,5	/	18,0	/	19,5
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>apigenin</i>	PP	15	/	311	/	42
	ng/ml	3,63	/	85,1	/	10,7
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>kemferol</i>	PP	6744	/	30872	/	26741
	ng/ml	112,31	/	583	/	495
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>luteolin</i>	PP	52	/	667	/	539
	ng/ml	8,30	/	87,3	/	70,7
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>hrizoeriol</i>	PP	313	/	579	/	448
	ng/ml	5,68	/	10,09	/	7,92
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>kvercetin</i>	PP	765	/	585	/	187
	ng/ml	135	/	105	/	37,4
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>izoramnetin</i>	PP	428	/	2178	/	425
	ng/ml	12,7	/	63,3	/	12,7
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>5-O-kafeoilhinska kiselina</i>	PP	212	/	123	/	313
	ng/ml	21,2	/	12,4	/	31,4
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>kemferol-3-O-Glc</i>	PP	31765	/	71846	4	49395
	ng/ml	2817	/	7428	/	4740
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>luteolin-7-O-Glc</i>	PP	54	/	99	/	206
	ng/ml	2,79	/	4,75	/	9,2
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>hiperozid (kvercetin-3-O-Gal)</i>	PP	899	/	/	/	/
	ng/ml	109	/	/	/	/
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>izokvercitrin (kvercetin-3-O-Glc)</i>	PP	19827	/	26948	/	16631
	ng/ml	2157	/	3013	/	1781
	mg/ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>rutin</i>	PP	29754	/	46442	17	56104
	ng/ml	5080	/	8257	/	10141
	mg/ml	0,04	2,00	0,04	2,00	0,04

PP – površina pika, * – očitana koncentracija sa kalibracione krive, # – početna koncentracija ekstrakta, Glc – glukozi, Rha – ramnozi, Gal – galaktozi

PC	Svojstvene vrednosti	% varijanse
1	6,53E+09	97,362
2	1,74E+08	2,5875
3	3,28E+06	0,048872
4	78973,5	0,001177
5	53733,2	0,000801
6	5188,37	7,73E-05



Slika 8.40. PCA rezultata LC-MS/MS kvantitativne analize derivata kvercetina u ekstraktima nadzemnih delova ispitivanih vrsta – scree plot (*biplot* prikazan na *Slici 4.8.*)

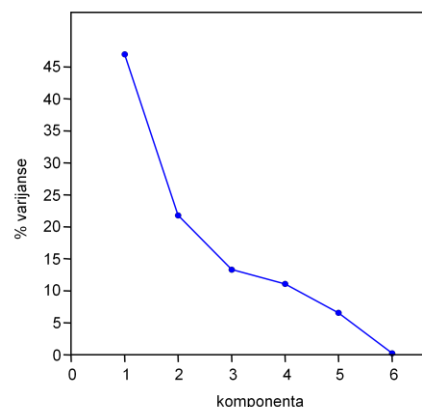
Tabela 8.10. PCA rezultata LC-MS/MS kvantitativne analize derivata kvercetina u ekstraktima nadzemnih delova ispitivanih vrsta – opterećenja (loadings) na šest glavnih komponenta (*biplot* prikazan na *Slici 4.8.*)

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
kvercetin	0,000561	0,01097	-0,01139	0,6005	0,3597	-0,7139
izoramnetin	0,00279	0,03711	-0,05718	0,6625	0,2707	0,6951
kvercitrin	-0,0004381	-3,15E-05	-0,01276	-0,4449	0,8923	0,07556
hiperozid	-0,00423	0,02192	0,998	0,0385	0,03074	0,03229
kvercetin-3-O-Glc	0,05281	0,9976	-0,01939	-0,03214	-0,01465	-0,01873
rutin	0,9986	-0,05277	0,005413	-0,000521	0,0003382	-0,000381

Tabela 8.11. PCA rezultata LC-MS/MS kvantitativne analize derivata kvercetina u ekstraktima nadzemnih delova ispitivanih vrsta – skorovi na šest glavnih komponenti (*biplot* prikazan na *Slici 4.8.*)

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
FH-1	1,49E+05	39807	-744,58	245,46	110,07	113,64
FH-2	27046	21311	-806,83	-448,73	-268,09	-204
FH-3	-26551	1994,2	-636,08	-58,323	-118,24	5,0239
FH-4	-31462	9429,8	-838,09	290,48	52,964	-22,2
CCH-1	-53522	-2341	-655,22	-57,029	-132,44	18,889
CCH-2	-50103	317,09	-707,1	-589,59	806,25	6,9155
CPH-1	-54169	-5264,7	-600,58	35,426	-89,052	79,075
CPH-2	-53369	-2641,6	-648,66	-47,623	-128,11	25,077
OH-1	-55209	-1672,5	363,68	-10,851	-96,865	33,332
PH-1	-54708	8744,9	7215,4	8,0213	16,097	-3,9121
MH-1	71359	-12342	141,72	18,182	2,3298	0,1393
MH-3	1,98E+05	-19210	777,01	-65,538	12,94	-12,667
MH-2	1,51E+05	-16108	508,19	-25,3	10,321	-12,474
FFH-1	-18482	-5408,5	-443,72	5,3952	-82,349	32,62
FFH-2	-44789	-3115,7	-608,09	54,739	-56,766	27,018
FFH-3	-44059	-5278,7	-593,7	827,49	328,79	-141,81
FGH-1	-24590	-3169,9	-513,59	-82,929	-127,6	20,445
PTH-1	-29814	-1315,1	-572,15	-129,39	-145,93	-40,359
RH-1	-55103	-3736,9	-637,61	30,113	-94,329	75,249

PC	Svojtvene vrednosti	% varijanse
1	1965	47,0
2	913	21,8
3	557	13,3
4	464	11,1
5	275	6,6
6	10,5	0,3



Slika 8.41. PCA rezultata LC-MS/MS kvantitativne analize derivata kvercetina u ekstraktima nadzemnih delova ispitivanih vrsta roda *Allium* – scree plot, rezultati normalizovani na najveću količinu datog jedinjenja kao 100% (biplot prikazan na Slici 4.9.)

Tabela 8.12. PCA rezultata LC-MS/MS kvantitativne analize derivata kvercetina u ekstraktima nadzemnih delova ispitivanih vrsta – opterećenja (loadings) na šest glavnih komponentata, rezultati normalizovani na najveću količinu datog jedinjenja kao 100% (biplot prikazan na Slici 4.9.)

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
kvercetin	0,601	0,3824	0,08653	-0,212	0,6247	-0,2233
izoramnetin	0,513	0,1144	0,06185	-0,00573	-0,2891	0,7977
kvercitrin	-0,08301	0,1173	0,7174	0,6642	0,1482	0,03942
hiperozid	-0,04644	0,2761	-0,6816	0,623	0,2281	0,1302
kvercetin-3-O-Glc	0,4604	0,1508	-0,04984	0,2585	-0,6343	-0,5419
rutin	0,3931	-0,8532	-0,08367	0,2428	0,2233	-0,04128

Tabela 8.13. PCA rezultata LC-MS/MS kvantitativne analize derivata kvercetina u ekstraktima nadzemnih delova ispitivanih vrsta roda *Allium* – skorovi na šest glavnih komponenti, rezultati normalizovani na najveću količinu datog jedinjenja kao 100% (biplot prikazan na Slici 4.9.)

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
FH-1	155,76	1,6914	3,5588	10,667	-17,893	5,0135
FH-2	34,212	-1,2797	-1,1729	4,3377	-26,734	-11,033
FH-3	-8,6513	3,4497	0,10626	-7,8771	-10,149	-0,2572
FH-4	35,549	27,533	5,053	-15,223	4,5057	-0,18753
CCH-1	-27,919	6,1616	0,088489	-10,949	-9,4242	0,45482
CCH-2	-28,968	20,337	72,109	55,531	7,0462	0,083168
CPH-1	-30,723	5,3574	0,45099	-12,055	-6,5789	3,3687
CPH-2	-28,17	5,9627	0,096392	-11,033	-9,1471	0,74398
OH-1	-26,26	11,675	-8,3339	-3,5455	-5,4749	1,2356
PH-1	-13,016	44,101	-67,229	52,487	11,907	0,085809
MH-1	-6,9149	-33,646	-2,2205	-0,33082	10,292	0,30819
MH-3	9,0625	-78,98	-7,579	11,501	17,416	-0,3815
MH-2	5,2151	-61,192	-5,3605	6,6131	15,022	-0,27992
FFH-1	-20,479	-4,4394	-0,56304	-8,9093	-3,082	1,3095
FFH-2	-18,651	7,8147	1,9076	-11,657	-2,6032	1,2211
FFH-3	41,591	42,433	9,8858	-32,135	49,901	-2,9177
FGH-1	-23,004	-3,6902	-0,89415	-7,5306	-8,7563	0,42899
PTH-1	-21,03	-0,25902	-0,39929	-7,859	-8,5093	-2,4127
RH-1	-27,604	6,9693	0,49582	-12,032	-7,7374	3,2159

8.5 ODREĐIVANJE UKUPNIH MONOMERNIH ANTOCIJANA

Tabela 8.14. Izmerene vrednosti apsorbancija ispitivanih ekstrakata pri pH=1

Vrsta	520 nm			700 nm			A _{1/520} - A _{1/700}	A _{2/520} - A _{2/700}	A _{3/520} - A _{3/700}
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₁	A ₂	A ₃			
<i>A. flavum</i> , Klisura Jerme	0,345	0,377	0,355	0,125	0,141	0,132	0,220	0,236	0,223
<i>A. flavum</i> , Dimitrovgrad	0,360	0,356	0,366	0,141	0,160	0,152	0,219	0,196	0,214
<i>A. flavum</i> , Vršački breg	0,104	0,100	0,112	0,014	0,015	0,018	0,090	0,086	0,094
<i>A. melanatherum</i> , Čemernik	0,702	0,714	0,709	0,358	0,360	0,346	0,344	0,354	0,363
<i>A. melanatherum</i> , Plana	0,499	0,519	0,512	0,231	0,260	0,246	0,268	0,259	0,266
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i> , Tara	0,804	0,833	0,820	0,371	0,351	0,365	0,433	0,482	0,455
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i> , Čemernik	0,498	0,493	0,490	0,089	0,088	0,085	0,409	0,405	0,405
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchellum</i> , Tara	0,829	0,859	0,835	0,337	0,340	0,335	0,492	0,518	0,500
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchellum</i> , Vlasinsko jezero	0,829	0,859	0,838	0,337	0,340	0,342	0,492	0,518	0,496
<i>A. fuscum</i> var. <i>fuscum</i> , Zaovine	0,253	0,289	0,254	0,075	0,076	0,074	0,178	0,213	0,180
<i>A. fuscum</i> var. <i>fuscum</i> , Derventa	0,439	0,388	0,391	0,077	0,074	0,082	0,361	0,314	0,309
<i>A. oleraceum</i> , Kosmovac	0,211	0,218	0,212	0,067	0,068	0,055	0,144	0,151	0,157
<i>A. paniculatum</i> , Titelski Breg	0,305	0,322	0,315	0,094	0,107	0,099	0,211	0,215	0,216
<i>A. pallens</i> , Beli Rzav, 2009.	0,112	0,125	0,115	0,008	0,009	0,005	0,104	0,116	0,110
<i>A. rhodopeum</i> , Dimitrovgrad	0,218	0,220	0,220	0,024	0,026	0,025	0,194	0,194	0,195

Tabela 8.15. Izmerene vrednosti apsorbancija ispitivanih ekstrakata pri pH=4,5

Vrsta	520 nm			700 nm			A _{1/520} -A _{1/700}	A _{2/520} -A _{2/700}	A _{3/520} -A _{3/700}
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₁	A ₂	A ₃			
<i>A. flavum</i> , Klisura Jerme	0,410	0,372	0,408	0,204	0,159	0,195	0,206	0,212	0,213
<i>A. flavum</i> , Dimitrovgrad	0,377	0,370	0,379	0,163	0,176	0,168	0,214	0,194	0,211
<i>A. flavum</i> , Vršački breg	0,078	0,073	0,075	0,007	0,008	0,008	0,071	0,065	0,067
<i>A. melanatherum</i> , Čemernik	0,647	0,652	0,650	0,363	0,358	0,360	0,285	0,293	0,290
<i>A. melanatherum</i> , Plana	0,602	0,603	0,601	0,367	0,351	0,357	0,235	0,253	0,244
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i> , Tara	0,769	0,751	0,758	0,450	0,430	0,439	0,319	0,320	0,319
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i> , Čemernik	0,176	0,169	0,172	0,050	0,047	0,049	0,126	0,122	0,123
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchellum</i> , Tara	0,669	0,667	0,665	0,372	0,364	0,363	0,297	0,304	0,302
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchellum</i> , Vlasinsko jezero	0,370	0,349	0,358	0,148	0,151	0,142	0,222	0,198	0,216
<i>A. fuscum</i> var. <i>fuscum</i> , Zaovine	0,225	0,249	0,230	0,086	0,090	0,095	0,139	0,159	0,135
<i>A. fuscum</i> var. <i>fuscum</i> , Derventa	0,404	0,373	0,375	0,094	0,096	0,089	0,310	0,277	0,286
<i>A. oleraceum</i> , Kosmovac	0,141	0,138	0,154	0,061	0,057	0,064	0,081	0,081	0,091
<i>A. paniculatum</i> , Titelski Breg	0,229	0,225	0,226	0,096	0,089	0,090	0,133	0,136	0,136
<i>A. pallens</i> , Beli Rzav, 2009.	0,104	0,101	0,100	0,014	0,016	0,014	0,090	0,085	0,086
<i>A. rhodopeum</i> , Dimitrovgrad	0,136	0,141	0,138	0,032	0,033	0,030	0,103	0,108	0,108

Tabela 8.16. Sadržaj ukupnih monomernih antocijana u ispitivanim uzorcima

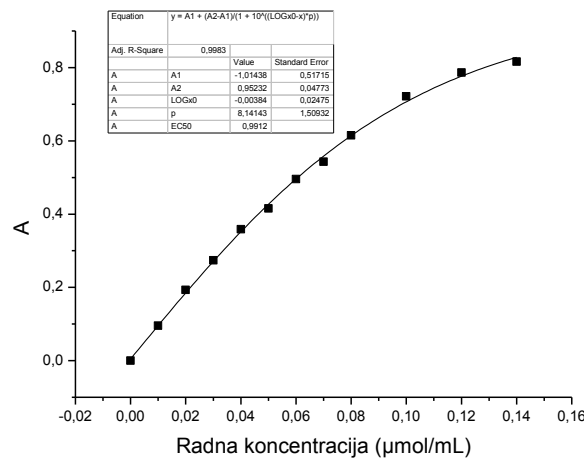
	F ^a	C ₁ [mg/g s.e.]	C ₂ [mg/g s.e.]	C ₃ [mg/g s.e.]	C _{sr} [mg/g s.e.] ^b
<i>A. flavum</i> , Klisura Jerme	20	47,42	79,49	33,40	53,4±23,6
<i>A. flavum</i> , Dimitrovgrad	20	16,36	5,680	10,02	10,7±5,4
<i>A. flavum</i> , Vršački breg	20	64,12	70,80	90,17	75,0±13,5
<i>A. melanatherum</i> , Čemernik	20	197,4	203,1	243,8	215±25,3
<i>A. melanatherum</i> , Plana	20	109,2	21,37	73,48	91,3±25,3
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i> , Tara	20	380,7	539,7	454,2	458±79,6
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i> , Čemernik	20	945,2	944,8	941,8	944±1,84
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchellum</i> , Tara	20	650,2	716,0	661,3	676±35,2
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchellum</i> , Vlasinsko jezero	20	901,7	1070	935,1	969±89,3
<i>A. fuscum</i> var. <i>fuscum</i> , Zaovine	10	65,82	90,36	75,14	77,1±12,4
<i>A. fuscum</i> var. <i>fuscum</i> , Derventa	10	84,63	61,40	38,64	61,5±23,0
<i>A. oleraceum</i> , Kosmovac	10	105,9	116,7	110,8	111±5,4
<i>A. paniculatum</i> , Titelski Breg	20	260,5	263,8	267,2	264±3,34
<i>A. pallens</i> , Beli Rzav, 2009.	20	46,09	102,9	80,15	76,4±28,6
<i>A. rhodopeum</i> , Dimitrovgrad	20	302,6	287,5	290,6	294±7,95

^a faktor razblaženja^b sadržaj antocijana je izražen u mg ekvivalenata cijanidin-3-glukozida po g suvog ekstrakta

8.6 ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ALIINAZE

Tabela 8.17. Podaci za konstrukciju kalibracione krive pirogroždane kiseline

V_{or} (mL)*	0,70	0,60	0,50	0,40	0,35	0,30	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05	0,00
C_{radna} ($\mu\text{mol/mL}$)	0,14	0,12	0,10	0,08	0,07	0,06	0,05	0,04	0,03	0,02	0,01	0,00
A_1	<u>0,816</u>	0,859	<u>0,775</u>	0,712	0,619	0,571	0,495	0,464	0,379	<u>0,274</u>	0,189	0,090
A_2	<u>0,849</u>	0,873	0,829	0,705	0,650	0,590	0,517	0,456	0,361	0,286	0,190	0,095
A_3	0,909	0,907	0,839	0,706	0,638	0,605	0,513	0,435	0,360	0,286	0,187	0,094
A_{sr}	0,909	0,880	0,814	0,708	0,636	0,589	0,508	0,452	0,367	0,286	0,188	0,093
$A_{sr}-A_{sro}^{**}$	0,816	0,787	0,721	0,615	0,543	0,496	0,415	0,359	0,274	0,193	0,095	0,000

* V_{or} – zapremina osnovnog rastvora pirogroždane kiseline ($C=1,6 \mu\text{mol/mL}$) koja je dodavana u probu** A_{sro} – srednja vrednost absorbance u probama u kojima je koncentracija piruvata 0

Grafik 7.1 Kalibraciona kriva standardnog rastvora pirogroždane kiseline

Tabela 8.18. Rezultati određivanja sadržaja pirogroždane kiseline na osnovu kojih je određena aktivnost aliinaze

	A			C [$\mu\text{mol piruvata/g}$ sveže lukovice]		
	Ispitivani uzorak	Korekcija	Slepa proba	Ispitivani uzorak	Korekcija	$C_{isp} - C_{kor}$
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i> Čemernik						
A_1	0,215	0,108	0,097	7,56		7,35
A_2	0,194	0,108	0,101	6,14	0,21	5,93
A_3	0,229	0,099	0,096	8,52		8,31
A_{sr}		0,105	0,098			7,20±1,20
<i>A. flavum</i> Bela Palanka						
A_1	0,609	0,126	0,097	34,9		32,9
A_2	0,618	0,134	0,101	35,7	1,95	33,7
A_3	0,629	0,164	0,096	36,6		34,7
A_{sr}		0,141	0,098			33,8±0,89
<i>A. flavum</i> Klisura Jerme						
A_1	0,890	0,141	0,110	49,5		47,8
A_2	0,857	0,150	0,109	45,2	1,65	43,6
A_3	0,900	0,134	-	50,9		49,2
A_{sr}		0,142	0,109			46,9±2,94
<i>A. flavum</i> Babušnica						
A_1	0,365	0,105	0,090	28,5		27,9
A_2	0,367	0,110	0,101	28,7	0,58	28,1
A_3	0,366	0,138	0,100	28,6		28,0
A_{sr}		0,107	0,101			28,0±0,12
<i>A. paniculatum</i>						
A_1	0,245	0,111	0,097	14,5		13,7
A_2	0,254	0,112	0,101	15,4	0,78	14,7
A_3	0,256	0,111	0,096	15,7		14,9
A_{sr}		0,111	0,098			14,4±0,61

<i>A. melanatherum</i> Čemernik						
A ₁	0,333	0,117	0,110	14,5		13,8
A ₂	0,331	0,103	0,109	14,4	0,71	13,7
A ₃	0,330	0,114	-	14,3		13,6
A _{sr}		0,111	0,109			13,7±0,11
<i>A. melanatherum</i> Plana						
A ₁	0,354	0,121	0,087	17,6		16,7
A ₂	0,357	0,104	0,107	17,8	0,87	16,9
A ₃	0,359	0,113	0,097	17,9		17,1
A _{sr}		0,113	0,097			16,9±0,19
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchellum</i> Vlasinsko jezero						
A ₁	0,192	0,110	0,110	4,76		4,22
A ₂	0,178	0,105	0,109	3,90	0,54	3,36
A ₃	0,178	0,120	-	3,90		3,36
A _{sr}		0,112	0,109			3,65±0,49
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchellum</i> Tara						
A ₁	0,485	0,127	0,090	28,3		26,5
A ₂	0,512	0,136	0,101	30,6	1,76	28,8
A ₃	0,508	0,137	0,100	30,3		28,5
A _{sr}	0,510	0,137	0,101			28,0±1,25
<i>A. rhodopeum</i>						
A ₁	0,345	0,106	0,087	16,9		16,1
A ₂	0,361	0,116	0,107	18,1	0,82	17,3
A ₃	0,388	0,127	0,097	20,1		19,3
A _{sr}		0,116	0,097			17,6±1,62
<i>A. fuscum</i> Beli Rzav						
A ₁	0,272	0,102	0,090	23,4		23,2
A ₂	0,277	0,100	0,101	24,1	0,16	23,9
A ₃	0,272	0,094	0,100	23,4		23,2
A _{sr}		0,101	0,101			23,4±0,41
<i>A. sativum</i> Šajkaš						
A ₁	0,524	0,118	0,090	24,5		23,5
A ₂	0,518	0,126	0,101	24,1	0,99	23,1
A ₃	0,517	0,115	0,100	24,0		23,0
A _{sr}		0,120	0,101			23,2±0,26

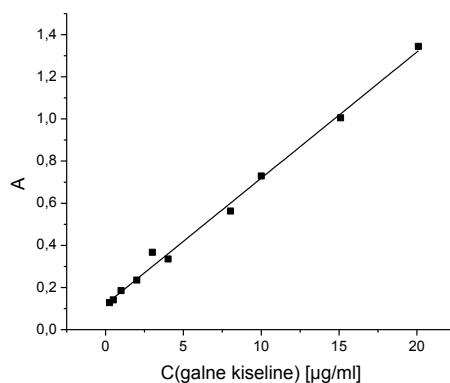
8.7 ANTIOKSIDANTNI POTENCIJAL EKSTRAKATA

Određivanje ukupnog redukcionog potencijala

Tabela 8.19. Podaci za konstrukciju kalibracione krive standardnog rastvora galne kiseline

C [µg/ml] ^a	20,10	15,10	10,00	8,03	4,02	3,01	2,01	1,00	0,50	0,25
A ₁	1,325	1,00	0,717	0,548	0,338	0,359	0,225	0,182	0,132	0,122
A ₂	1,352	1,10	0,728	0,572	0,332	0,369	0,248	0,188	0,152	0,131
A ₃	1,354	0,94	0,741	0,569	0,335	0,372	0,231	0,185	0,140	0,13
Asr	1,344	1,013	0,729	0,563	0,335	0,367	0,235	0,185	0,141	0,128

^a Radna koncentracija galne kiseline



Grafik 8.2. Kalibraciona kriva standardnog rastvora galne kiseline

Tabela 8.20. Očitane vrednosti absorbancija za različite koncentracije ispitivanih ekstrakta

Vrsta	C _{radna} [mg/ml]	A ₁	A ₂	A ₃	A _{sr}	A _{kor}	A _{sr} - A _{kor}
<i>A. flavum</i> , Klisura Jerme	0,20	0,250	0,282	0,258	0,263	0,047	0,215
	0,10	0,213	0,209	0,200	0,207	0,043	0,164
	0,05	0,122	0,136	0,120	0,126	0,050	0,076
<i>A. flavum</i> , Dimitrovgrad	0,20	0,342	0,335	0,362	0,346	0,049	0,298
	0,10	0,244	0,253	0,233	0,243	0,049	0,194
	0,05	0,154	0,158	0,168	0,160	0,048	0,112
<i>A. flavum</i> , Mokra Gora	0,20	0,326	0,311	0,313	0,317	0,047	0,269
	0,10	0,236	0,231	0,219	0,229	0,047	0,182
	0,05	0,144	0,138	0,131	0,138	0,049	0,089
<i>A. flavum</i> , Vršački breg	0,20	0,354	0,351	0,350	0,352	0,046	0,306
	0,10	0,246	0,238	0,235	0,240	0,047	0,193
	0,05	0,156	0,155	0,163	0,158	0,048	0,110
<i>A. flavum</i> , Babušnica	0,20	0,207	0,286	0,290	0,288	0,043	0,245
	0,10	0,148	0,210	0,207	0,209	0,043	0,166
	0,05	0,117	0,147	0,147	0,147	0,048	0,100
<i>A. flavum</i> , Bela Palanka	0,20	0,200	0,245	0,242	0,244	0,044	0,200
	0,10	0,120	0,164	0,159	0,162	0,044	0,118
	0,05	0,097	0,121	0,120	0,112	0,051	0,061
<i>A. melanatherum</i> , Čemernik	0,20	0,175	0,230	0,226	0,228	0,049	0,179
	0,10	0,126	0,175	0,152	0,163	0,042	0,122
	0,05	0,104	0,113	0,113	0,110	0,047	0,063
<i>A. melanatherum</i> , Plana	0,20	0,205	0,251	0,261	0,256	0,047	0,209
	0,10	0,185	0,191	0,182	0,186	0,043	0,143
	0,05	0,108	0,126	0,124	0,119	0,060	0,059
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i> , Tara	0,20	0,187	0,185	0,201	0,191	0,052	0,139
	0,10	0,126	0,129	0,132	0,129	0,052	0,078
	0,05	0,115	0,104	0,106	0,108	0,053	0,055
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i> , Čemernik	0,20	0,204	0,198	0,202	0,202	0,052	0,150
	0,10	0,138	0,139	0,138	0,138	0,067	0,072
	0,05	0,104	0,108	0,107	0,106	0,055	0,051
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchellum</i> , Tara	0,20	0,237	0,228	0,223	0,229	0,048	0,181
	0,10	0,189	0,195	0,190	0,192	0,043	0,149
	0,05	0,119	0,114	0,121	0,118	0,049	0,070
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchellum</i> , Vlasinsko jezero	0,20	0,223	0,224	0,228	0,225	0,047	0,178
	0,10	0,162	0,154	0,165	0,160	0,048	0,113
	0,05	0,116	0,111	0,116	0,114	0,047	0,067
<i>A. fuscum</i> var. <i>fuscum</i> , Beli Rzav	0,20	0,314	0,343	0,338	0,332	0,049	0,283
	0,10	0,165	0,215	0,231	0,223	0,053	0,170
	0,05	0,130	0,144	0,141	0,138	0,050	0,088
<i>A. fuscum</i> var. <i>fuscum</i> , Zaovine	0,25	0,285	0,247	0,248	0,248	0,051	0,197
	0,50	0,423	0,355	0,358	0,357	0,058	0,298
	1,00	0,656	0,566	0,568	0,567	0,051	0,516
<i>A. fuscum</i> var. <i>gracile</i> , Tara	0,20	0,335	0,385	0,384	0,384	0,048	0,337
	0,10	0,215	0,240	0,245	0,243	0,050	0,193
	0,05	0,153	0,163	0,161	0,159	0,052	0,107
<i>A. pallens</i> , Beli Rzav, 2009.	0,20	0,189	0,213	0,209	0,204	0,052	0,152
	0,10	0,135	0,143	0,143	0,143	0,045	0,098
	0,05	0,094	0,109	0,109	0,104	0,047	0,057
<i>A. pallens</i> , Beli Rzav, 2010.	0,25	0,235	0,232	0,230	0,232	0,048	0,184
	0,50	0,348	0,373	0,357	0,359	0,049	0,310
	1,00	0,557	0,543	0,534	0,545	0,049	0,496
<i>A. oleraceum</i> , Kosmovac	0,25	0,238	0,235	0,233	0,235	0,050	0,186
	0,50	0,372	0,371	0,377	0,373	0,049	0,324
	1,00	0,620	0,603	0,598	0,607	0,049	0,558
<i>A. paniculatum</i> , Titelski Breg	0,20	0,296	0,311	0,320	0,309	0,047	0,262
	0,10	0,166	0,211	0,209	0,210	0,045	0,165
	0,05	0,141	0,142	0,154	0,145	0,048	0,097
<i>A. rhodopeum</i> , Dimitrovgrad	0,20	0,198	0,188	0,189	0,192	0,042	0,150
	0,10	0,143	0,136	0,138	0,139	0,043	0,097
	0,05	0,120	0,105	0,109	0,111	0,046	0,066
<i>A. cepa</i> , Neradin	0,25	0,680	0,675	0,632	0,662	0,053	0,610
	0,50	0,750	0,648	0,766	0,758	0,052	0,669
	1,00	1,392	1,264	1,333	1,330	0,053	1,277

Tabela 8.21. Ukupni redukcionni potencijal metanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Allium*

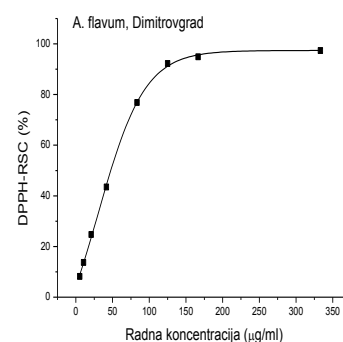
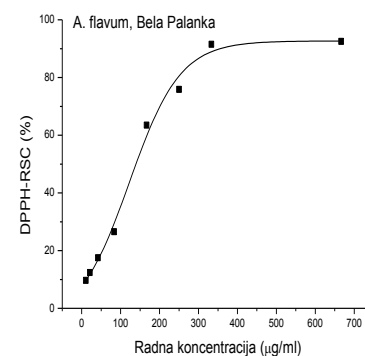
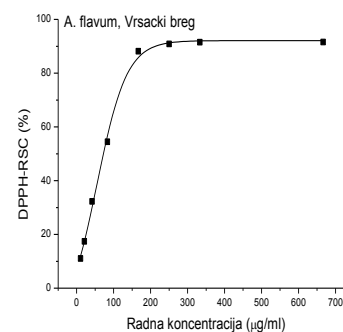
Vrsta	mg/ml ^a	µg/ml ^b	mg/g s. e. ^c	mg/g s. e. ^c (srednja vrednost)
<i>A. flavum</i> , Klisura Jerme	0,20	1,59	7,96	7,68±0,39
	0,10	0,74	7,41	
	0,05	/	/	
<i>A. flavum</i> , Dimitrovgrad	0,20	2,98	14,88	13,65±1,73
	0,10	1,24	12,43	
	0,05	/	/	
<i>A. flavum</i> , Mokra Gora	0,20	2,48	12,40	11,40±1,40
	0,10	1,04	10,41	
	0,05	/	/	
<i>A. flavum</i> , Vršački breg	0,20	3,10	15,51	13,85±2,36
	0,10	1,22	12,18	
	0,05	/	/	
<i>A. flavum</i> , Babušnica	0,20	2,10	10,51	9,10±1,98
	0,10	0,77	7,70	
	0,05	/	/	
<i>A. flavum</i> , Bela Palanka	0,20	1,38	6,92	6,92
	0,10	/	/	
	0,05	/	/	
<i>A. melanantherum</i> , Čemernik	0,20	1,06	5,31	5,31
	0,10	/	/	
	0,05	/	/	
<i>A. melanantherum</i> , Plana	0,20	1,52	7,61	5,75±2,63
	0,10	0,39	3,88	
	0,05	/	/	
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i> , Tara	0,20	0,43	2,15	2,15
	0,10	/	/	
	0,05	/	/	
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i> , Čemernik	0,20	0,59	2,98	2,98
	0,10	/	/	
	0,05	/	/	
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchellum</i> , Tara	0,20	1,09	5,47	5,18±0,40
	0,10	0,49	4,90	
	0,05	/	/	
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchellum</i> , Vlasinsko jezero	0,20	1,04	5,21	5,21
	0,10	/	/	
	0,05	/	/	
<i>A. fuscum</i> var. <i>fuscum</i> , Beli Rzav	0,20	2,67	13,35	11,25±2,97
	0,10	0,91	9,15	
	0,05	/	/	
<i>A. fuscum</i> var. <i>fuscum</i> , Zaovine	0,25	1,29	5,16	5,91±0,73
	0,50	2,98	5,96	
	1,00	6,61	6,61	
<i>A. fuscum</i> var. <i>gracile</i> , Tara	0,20	3,62	18,12	15,18±4,16
	0,10	1,22	12,25	
	0,05	/	/	
<i>A. pallens</i> , Beli Rzav, 2009.	0,20	0,63	3,14	3,14
	0,10	/	/	
	0,05	/	/	
<i>A. pallens</i> , Beli Rzav, 2010.	0,25	1,08	4,33	5,66±1,15
	0,50	3,18	6,37	
	1,00	6,28	6,28	
<i>A. oleraceum</i> , Kosmovac	0,25	1,10	4,42	6,19±1,55
	0,50	3,42	6,84	
	1,00	7,31	7,32	
<i>A. paniculatum</i> , Titelski Breg	0,20	2,37	11,83	10,07±2,49
	0,10	0,83	8,31	
	0,05	/	/	
<i>A. rhodopeum</i> , Dimitrovgrad	0,20	0,60	2,98	2,98
	0,10	/	/	
	0,05	/	/	
<i>A. cepa</i> , Neradin	0,25	8,18	32,72	18,83±0,69
	0,50	9,17	18,34	
	1,00	19,32	19,32	

^a radna koncentracija ekstrakta^b koncentracija ekvivalenata galne kiseline očitana sa kalibracione krive^c sadržaj fenola izražen u mg ekvivalenata galne kiseline po g suvog ekstrakta

Sposobnost hvatanja DPPH radikala (DPPH-RSC)

Tabela 8.22. Rezultati DPPH testa za ekstrakte vrste *A. flavum* sa različitih lokaliteta

Radna konc. (µg/ml)	Absorbancija				DPPH-RSC(%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A _{kor}	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>A. flavum</i>, Vršački breg								
667	0,062	0,062	0,060	0,046	91,21	91,10	92,40	91,57
333	0,061	0,061	0,065	0,044	91,09	90,81	88,22	91,49
250	0,062	0,062	0,060	0,045	90,71	90,54	91,39	90,88
167	0,069	0,066	0,061	0,044	86,44	87,51	90,46	88,14
83,3	0,126	0,129	0,118	0,042	54,43	51,76	57,18	54,46
41,7	0,167	0,168	0,157	0,042	32,31	29,48	34,97	32,25
20,8	0,195	0,200	0,178	0,042	16,99	12,08	23,16	17,41
10,4	0,205	0,213	0,190	0,043	11,74	4,79	16,54	11,03
kontrola	0,226	0,221	0,219	0,042				
IC ₅₀ (µg/ml)					72,74	75,61	68,63	72,3±2,46
<i>A. flavum</i>, Bela Palanka								
667	0,059	0,060	0,060	0,042	93,17	92,00	92,32	92,49
333	0,061	0,063	0,063	0,043	90,85	89,75	89,33	91,49
250	0,086	0,090	0,089	0,042	77,62	74,92	75,04	75,86
167	0,104	0,113	0,111	0,043	67,11	61,41	61,99	63,50
83,3	0,163	0,181	0,180	0,044	34,51	22,74	22,47	26,57
41,7	0,192	0,195	0,185	0,043	18,48	14,50	19,56	17,51
20,8	0,198	0,202	0,200	0,042	15,17	10,97	11,01	12,39
10,4	0,213	0,201	0,202	0,042	7,34	11,64	10,00	9,66
kontrola	0,226	0,221	0,219	0,042				
IC ₅₀ (µg/ml)					121,77	148,39	146,11	147±1,14
<i>A. flavum</i>, Dimitrovgrad								
333	0,063	0,064	0,062	0,059	97,31	96,78	98,04	97,38
167	0,061	0,064	0,063	0,055	95,88	94,11	94,72	94,91
125	0,067	0,064	0,064	0,053	90,96	92,72	93,03	92,24
83,3	0,085	0,085	0,087	0,049	77,09	77,11	76,24	76,81
41,7	0,135	0,139	0,141	0,048	45,57	43,08	41,83	43,50
20,8	0,161	0,167	0,163	0,043	26,33	22,67	25,22	24,74
10,4	0,182	0,183	0,187	0,046	14,93	14,40	11,77	13,70
5,21	0,191	0,195	0,191	0,046	9,27	6,48	8,85	8,20
kontrola	0,201	0,200	0,208	0,043				
IC ₅₀ (µg/ml)					45,68	48,01	48,83	47,5±1,22



Grafici 8.3.–8.5. Krive zavisnosti DPPH-RSC od radne koncentracije ekstrakta za vrstu *A. flavum* sa različitih lokaliteta

Tabela 8.23. Rezultati DPPH testa za ekstrakte vrste *A. flavum* sa različitih lokaliteta

Radna konc. ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancija				DPPH-RSC(%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A _{kor}	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>A. flavum</i>, Klisura Jerme								
667	0,067	0,069	0,066	0,049	88,18	87,24	88,74	88,05
333	0,069	0,066	0,067	0,044	84,05	86,05	85,16	85,09
250	0,064	0,069	0,068	0,043	86,44	83,35	83,90	84,56
167	0,074	0,083	0,084	0,045	81,30	74,97	74,61	76,96
83,3	0,137	0,134	0,135	0,045	40,92	42,59	41,98	41,83
41,7	0,170	0,165	0,165	0,057	27,11	30,33	30,28	29,24
20,8	0,184	0,188	0,182	0,044	9,39	7,13	10,64	9,05
10,4	0,196	0,198	0,191	0,044	1,54	0,36	4,79	2,23
kontrola	0,202	0,201	0,201	0,046				
IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)					88,30	91,13	89,98	89,8 \pm 1,00
<i>A. flavum</i>, Mokra Gora								
667	0,063	0,065	0,063	0,046	89,27	88,12	89,48	88,96
333	0,068	0,064	0,075	0,044	84,56	86,98	79,76	83,76
250	0,074	0,064	0,076	0,045	81,45	87,55	79,94	82,98
1667	0,075	0,099	0,076	0,045	81,04	65,83	80,08	75,65
83,3	0,130	0,124	0,133	0,043	44,50	48,03	42,71	45,08
41,7	0,164	0,165	0,165	0,043	22,58	21,63	21,67	21,96
20,8	0,182	0,182	0,186	0,046	12,59	12,28	10,01	11,63
kontrola	0,202	0,201	0,201	0,045				
IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)					90,88	96,26	92,80	93,3 \pm 1,96
<i>A. flavum</i>, Babušnica								
667	0,071	0,071	0,067	0,047	84,28	84,44	87,11	85,28
333	0,065	0,070	0,074	0,049	89,14	85,84	83,40	86,13
250	0,078	0,080	0,073	0,045	78,17	77,25	81,47	78,96
167	0,108	0,098	0,107	0,045	59,22	65,58	60,09	61,63
83,3	0,136	0,145	0,154	0,045	41,01	35,03	29,50	35,18
41,7	0,195	0,175	0,179	0,066	16,25	29,15	26,60	24,00
20,8	0,192	0,189	0,191	0,044	3,77	6,14	4,91	4,94
10,4	0,197	0,195	0,191	0,043	0,18	1,34	4,01	1,84
kontrola	0,202	0,201	0,201	0,047				
IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)					116,30	108,68	127,17	117 \pm 6,52

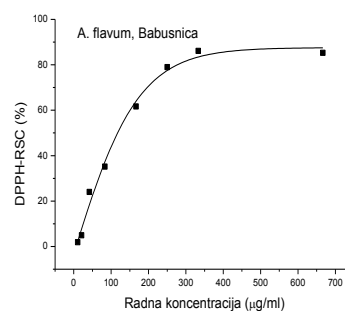
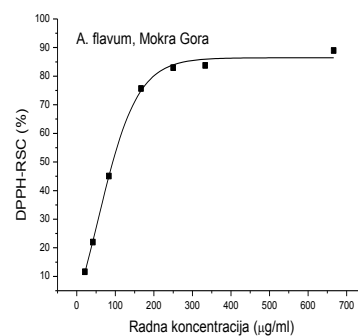
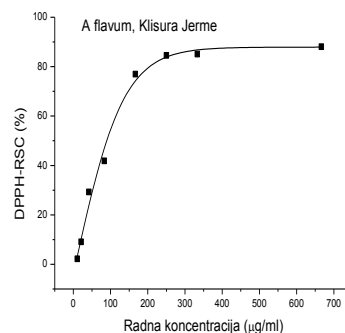
Grafici 8.6.–8.8. Krive zavisnosti DPPH-RSC od radne koncentracije ekstrakta za vrstu *A. flavum* sa različitih lokaliteta

Tabela 8.24. Rezultati DPPH testa za ekstrakte vrsta *A.oleraceum* i *A. melanatherum* sa različitim lokaliteta

Radna konc. (µg/ml)	Absorbancija				DPPH-RSC(%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A _{kor}	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>A. oleraceum</i>, Kosmovac								
333	0,060	0,088	0,073	0,040	87,15	68,46	78,25	77,80
250	0,076	0,095	0,097	0,042	77,14	64,67	63,08	70,91
167	0,123	0,103	0,135	0,042	46,49	59,63	38,35	53,06
83,3	0,162	0,153	0,155	0,041	19,91	25,92	24,77	22,92
41,7	0,169	0,167	0,168	0,041	15,35	16,32	15,75	15,83
20,8	0,182	0,187	0,190	0,041	6,59	3,41	1,12	5,00
10,4	0,193	0,191	0,192	0,042	0,09	1,32	0,65	0,70
kontrola	0,198	0,192	0,192	0,043				
C ₅₀ (µg/ml)					169,73	137,17	197,19	153±16,3
<i>A. melanatherum</i>, Plana								
667	0,058	0,050	0,060	0,047	92,83	97,98	91,75	94,19
333	0,067	0,068	0,068	0,043	84,69	84,06	84,22	84,32
250	0,085	0,083	0,079	0,043	73,35	74,61	77,13	75,03
167	0,090	0,093	0,085	0,044	70,82	69,44	74,22	71,49
83,3	0,117	0,121	0,117	0,042	53,06	50,86	52,84	52,25
41,7	0,154	0,158	0,153	0,044	30,94	28,67	31,77	30,46
20,8	0,179	0,179	0,178	0,043	14,79	14,75	15,44	14,99
10,4	0,188	0,190	0,191	0,042	8,31	7,15	6,18	7,21
kontrola	0,201	0,200	0,208	0,043				
IC ₅₀ (µg/ml)					86,38	95,65	79,61	87,2±5,62
<i>A. melanatherum</i>, Čemernik								
667	0,060	0,069	0,062	0,047	91,64	85,92	90,11	89,22
333	0,064	0,063	0,063	0,043	86,61	86,96	87,06	86,88
250	0,063	0,065	0,064	0,043	87,37	85,84	86,24	86,48
167	0,065	0,067	0,065	0,044	86,41	85,27	86,80	86,16
83,3	0,104	0,105	0,102	0,042	61,28	60,30	62,28	61,29
41,7	0,147	0,154	0,137	0,044	34,70	30,61	41,62	35,64
20,8	0,167	0,180	0,161	0,043	21,55	13,49	25,15	20,06
10,4	0,189	0,189	0,185	0,042	7,04	7,00	9,68	7,91
kontrola	0,201	0,202	0,201	0,043				
IC ₅₀ (µg/ml)					61,59	66,97	53,90	60,8±4,61

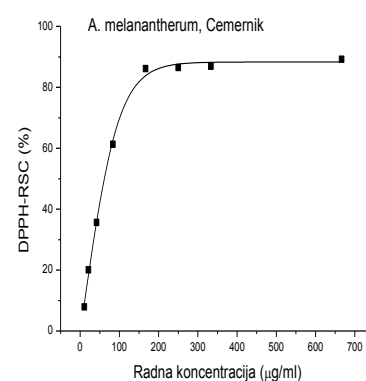
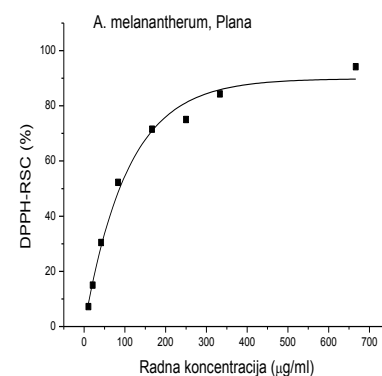
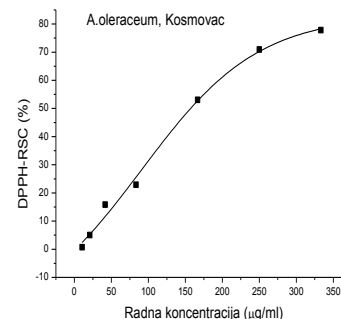
Grafici 8.9.–8.11. Krive zavisnosti DPPH-RSC od radne koncentracije ekstrakta za vrste *A.oleraceum* i *A. melanatherum*

Tabela 8.25. Rezultati DPPH testa za ekstrakte vrsta *A. pallens*, *A. rhodopeum* i *A. carinatum* subsp. *pulchellum*

Radna konc. ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancija				DPPH-RSC(%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A _{kor}	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>A. pallens</i> subsp. <i>tenuiflorum</i> , Beli Rzav								
333	0,056	0,057	0,056	0,043	92,14	92,08	92,25	92,16
250	0,058	0,061	0,060	0,043	91,02	89,40	89,81	90,08
167	0,091	0,088	0,097	0,043	71,75	73,48	68,24	71,16
83,3	0,149	0,154	0,160	0,043	37,31	34,49	30,89	34,23
41,7	0,176	0,187	0,177	0,041	19,99	13,61	19,20	17,60
20,8	0,186	0,198	0,198	0,040	14,01	6,64	6,60	9,08
10,4	0,194	0,208	0,204	0,041	9,84	1,40	3,96	5,06
kontrola	0,201	0,208	0,199	0,044				
C_{50} ($\mu\text{g/ml}$)					112	120	111	114 \pm 4,04
<i>A. rhodopeum</i> , Dimitrovgrad								
333	0,065	0,066	0,064	0,052	92,10	91,67	92,87	92,21
83,3	0,162	0,166	0,160	0,048	30,62	27,75	31,58	29,99
66,7	0,167	0,167	0,163	0,050	28,23	28,39	30,45	29,03
41,7	0,187	0,188	0,179	0,056	19,50	19,22	24,58	21,10
33,3	0,183	0,194	0,180	0,047	16,67	11,63	18,58	17,62
20,8	0,197	0,197	0,188	0,063	17,54	17,38	23,22	17,46
10,4	0,230	0,215	0,211	0,061	-3,28	5,76	8,33	3,60
kontrola	0,2066	0,2134	0,2037	0,045				
IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)					133	156	137	142 \pm 12,2
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchellum</i> , Vlasinsko jezero								
667	0,065	0,064	0,070	0,052	91,55	92,45	88,85	90,95
333	0,086	0,083	0,102	0,048	76,65	78,21	66,67	73,85
250	0,118	0,115	0,116	0,046	54,99	56,89	56,20	56,03
167	0,134	0,159	0,143	0,046	44,75	29,49	39,18	37,81
83,3	0,151	0,167	0,172	0,047	34,87	24,90	22,16	27,31
41,7	0,167	0,168	0,179	0,047	24,87	23,93	17,30	22,03
20,9	0,194	0,192	0,195	0,047	7,91	9,34	7,13	8,13
10,4	0,208	0,203	0,196	0,050	1,19	4,40	8,44	4,67
kontrola	0,213	0,203	0,206	0,047				
IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)					476	225	220	222 \pm 2,55

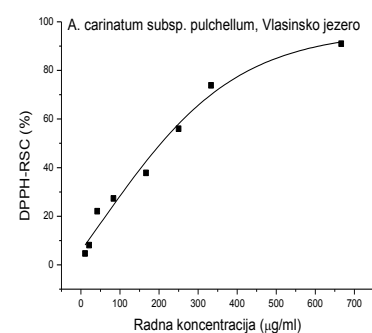
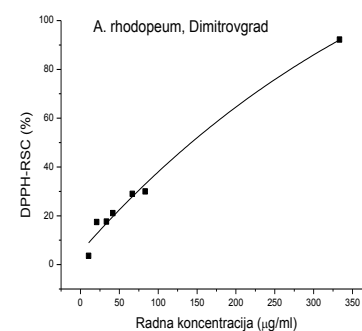
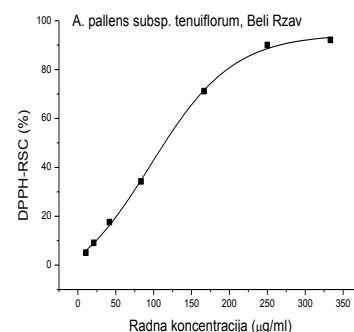
Grafici 8.9.–8.11. Krive zavisnosti DPPH-RSC od radne koncentracije ekstrakta za vrste *A. oleraceum* i *A. melanatherum*

Tabela 8.26. Rezultati DPPH testa za ekstrakte podvrsta *A. carinatum* subsp. *pulchellum* i *A. carinatum* subsp. *carinatum*

Radna konc. (µg/ml)	Absorbancija				DPPH-RSC(%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A _{kor}	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchellum</i> , Tara								
667	0,063	0,063	0,060	0,0543	94,88	94,62	96,71	95,40
333	0,061	0,061	0,058	0,0478	92,14	92,09	93,63	92,62
250	0,061	0,066	0,061	0,0463	91,24	88,31	91,02	90,19
167	0,073	0,089	0,063	0,0447	83,15	73,32	88,80	81,76
83,3	0,126	0,139	0,132	0,0453	51,85	43,83	48,09	47,92
41,7	0,173	0,166	0,168	0,0477	25,20	28,94	27,76	27,30
20,8	0,190	0,185	0,187	0,0426	11,43	14,95	13,43	13,27
10,4	0,206	0,197	0,198	0,0423	1,86	7,35	7,00	5,40
kontrola	0,213	0,214	0,213	0,046				
C ₅₀ (µg/ml)					79,2	92,4	81,7	84,4±5,34
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i> , Čemernik								
667	0,062	0,066	0,064	0,0469	90,14	87,88	89,09	89,04
333	0,096	0,096	0,075	0,0438	66,54	66,53	79,89	70,99
250	0,114	0,111	0,101	0,0435	54,28	56,78	62,75	57,94
167	0,133	0,124	0,142	0,0434	42,11	48,12	36,50	42,24
83,3	0,160	0,162	0,162	0,0428	24,55	23,15	22,95	23,55
41,7	0,181	0,187	0,188	0,0430	10,92	7,16	6,16	8,08
kontrola	0,201	0,196	0,210	0,047				
IC ₅₀ (µg/ml)					197	202	215	205±6,60
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i> , Tara								
667	0,057	0,059	0,058	0,051	96,20	95,35	96,00	96,10
333	0,061	0,066	0,065	0,048	92,02	88,78	89,57	90,79
250	0,064	0,076	0,084	0,045	88,70	84,43	76,92	82,81
167	0,099	0,111	0,099	0,045	67,93	60,37	67,62	67,77
83,3	0,135	0,164	0,149	0,053	50,67	33,14	42,45	46,56
41,7	0,175	0,182	0,179	0,044	20,74	16,95	18,47	19,61
20,8	0,195	0,199	0,195	0,044	9,27	6,78	8,71	8,99
10,4	0,199	0,203	0,208	0,043	5,94	3,47	0,51	3,22
kontrola	0,211	0,209	0,218	0,046				
IC ₅₀ (µg/ml)					94,0	129	108	101±6,91

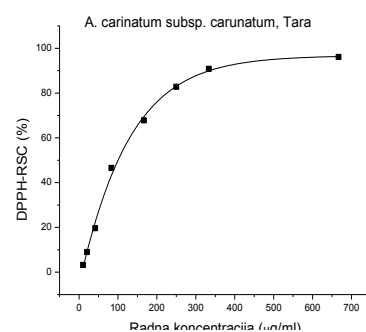
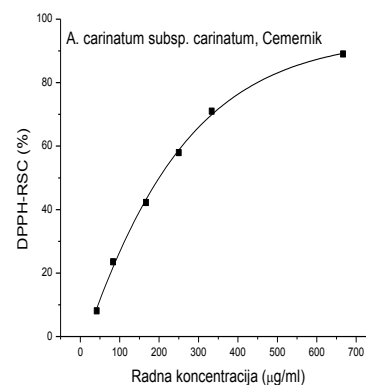
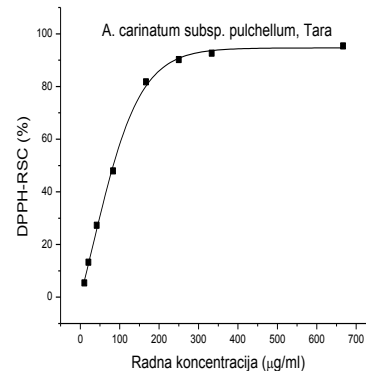
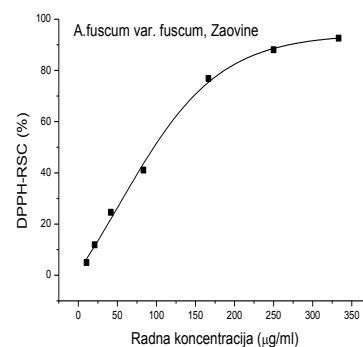
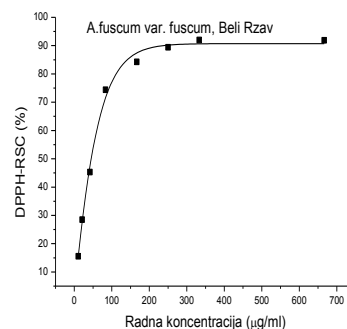
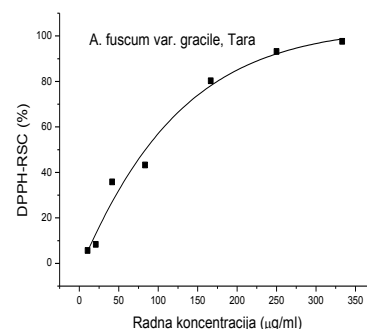
**Grafici 8.12.–8.14.** Krive zavisnosti DPPH-RSC od radne koncentracije ekstrakta za vrste *A. oleraceum* i *A. melanatherum*

Tabela 8.27. Rezultati DPPH testa za ekstrakte vrste *A. fuscum* sa različitih lokaliteta

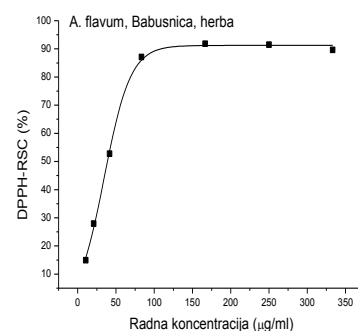
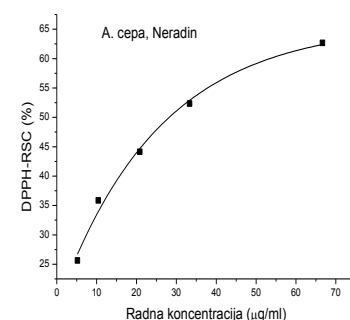
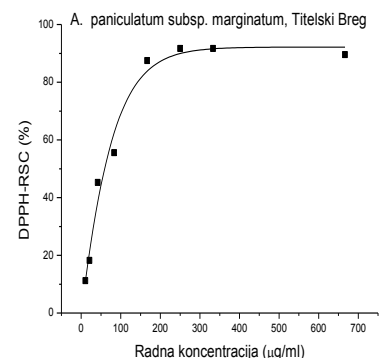
Radna konc. (µg/ml)	Absorbancija				DPPH-RSC(%)			
	A-1	A-2	A-3	A _{kor}	RSC-1	RSC-2	RSC-3	Srednja vrednost
<i>A. fuscum</i> var. <i>gracile</i>, Tara								
333	0,066	0,074	0,065	0,062	97,53	92,62	97,71	97,62
250	0,062	0,074	0,063	0,052	93,31	86,12	92,93	93,12
167	0,077	0,064	0,089	0,051	83,92	91,62	76,57	80,24
83,3	0,140	0,095	0,140	0,047	43,22	71,07	43,31	43,26
41,7	0,157	0,154	0,158	0,053	36,08	38,21	35,51	35,79
20,8	0,186	0,185	0,200	0,044	12,69	13,22	4,05	8,37
10,4	0,202	0,206	0,202	0,048	5,87	3,32	5,40	5,63
kontrola	0,223	0,211	0,201	0,049				
C ₅₀ (µg/ml)					81,7	54,0	86,8	84,3±2,56
<i>A. fuscum</i> var. <i>fuscum</i>, Beli Rzav								
667	0,072	0,067	0,064	0,054	89,48	92,06	94,00	91,85
333	0,063	0,061	0,062	0,049	91,26	92,78	91,94	91,99
250	0,072	0,061	0,060	0,047	84,90	91,30	91,94	89,38
167	0,071	0,081	0,067	0,047	85,55	79,09	88,04	84,23
83,3	0,087	0,091	0,095	0,049	76,63	74,68	71,81	74,37
41,7	0,138	0,138	0,129	0,045	43,51	43,39	48,99	45,29
20,8	0,172	0,184	0,155	0,054	27,54	20,22	37,77	28,51
10,4	0,194	0,192	0,178	0,050	11,92	12,75	21,91	15,52
kontrola	0,201	0,196	0,210	0,047				
IC ₅₀ (µg/ml)					48,9	40,1	45,9	45,0±3,22
<i>A. fuscum</i> var. <i>fuscum</i>, Zaovine								
333	0,056	0,055	0,055	0,043	92,23	92,70	92,77	92,57
250	0,066	0,058	0,066	0,043	86,66	91,15	86,40	88,07
167	0,082	0,083	0,082	0,043	77,30	76,22	76,94	76,82
83,3	0,143	0,145	0,139	0,043	40,60	39,39	43,27	41,09
41,7	0,177	0,168	0,171	0,045	21,60	27,19	24,96	24,58
20,8	0,194	0,189	0,188	0,042	9,66	12,51	13,46	11,88
10,4	0,206	0,201	0,200	0,042	3,09	5,76	6,17	5,01
kontrola	0,213	0,215	0,205	0,042				
IC ₅₀ (µg/ml)					98,1	97,9	93,9	96,6±1,83



Grafici 8.13.–8.15. Krive zavisnosti DPPH-RSC od radne koncentracije ekstrakta za vrstu *A. fuscum* sa različitih lokaliteta

Tabela 828. Rezultati DPPH testa za ekstrakte vrsta *A. paniculatum*, *A. cepa* i ekstrakt nadzemnog dela vrste *A. flavum*

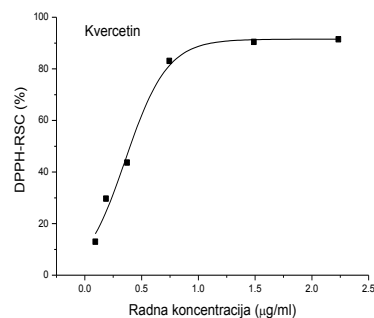
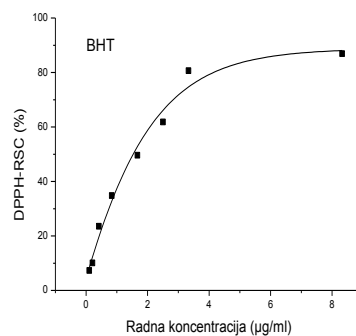
Radna konc. (µg/ml)	Absorbancija				DPPH-RSC(%)			
	A-1	A-2	A-3	A _{kor}	RSC-1	RSC-2	RSC-3	Srednja vrednost
<i>A. paniculatum</i> subsp. <i>marginatum</i>, Titelski Breg								
667	0,068	0,066	0,065	0,049	88,62	89,69	90,31	89,54
333	0,060	0,061	0,062	0,046	92,43	91,31	91,24	91,66
250	0,060	0,060	0,060	0,046	91,83	91,77	91,43	91,68
167	0,075	0,059	0,062	0,044	82,05	91,10	89,30	87,48
83,3	0,117	0,127	0,116	0,044	57,40	51,50	57,91	55,60
41,7	0,141	0,145	0,128	0,044	43,75	40,96	51,07	45,26
20,8	0,190	0,185	0,188	0,047	16,66	19,85	18,11	18,21
10,4	0,204	0,196	0,189	0,044	6,47	11,52	15,60	11,19
kontrola	0,228	0,218	0,216	0,048				
C₅₀ (µg/ml)					59,6	67,2	53,2	60,0±4,79
<i>A. cepa</i>, Neradin								
83,3	0,095	0,077	0,084	0,056	82,38	90,74	87,59	86,56
66,7	0,136	0,141	0,146	0,055	63,82	61,53	59,27	62,68
33,3	0,149	0,152	0,158	0,044	53,02	51,68	48,87	52,35
20,8	0,167	0,174	0,172	0,046	45,74	42,55	43,31	44,14
10,4	0,201	0,198	0,199	0,056	35,19	36,50	36,05	35,85
5,21	0,213	0,206	0,205	0,044	24,18	27,09	27,60	25,63
kontrola	0,262	0,273	0,268	0,045				
C₅₀ (µg/ml)					30,1	30,4	33,2	31,2±1,33
<i>A. flavum</i>, Babušnica, herba								
333	0,074	0,072	0,069	0,053	88,12	89,60	91,21	89,65
250	0,072	0,067	0,066	0,050	88,02	90,91	91,43	91,49
167	0,062	0,062	0,061	0,047	91,63	91,67	92,12	91,80
83,3	0,061	0,067	0,077	0,045	91,14	87,66	82,60	87,13
41,7	0,114	0,134	0,135	0,043	60,64	49,05	48,52	52,74
20,8	0,160	0,177	0,179	0,042	34,78	24,95	24,09	27,94
10,4	0,190	0,200	0,201	0,044	18,85	13,32	12,50	14,89
kontrola	0,225	0,227	0,226	0,046				
IC₅₀ (µg/ml)					32,7	41,6	42,6	42,1±0,53



Grafici 8.15.–8.18. Krive zavisnosti DPPH-RSC od radne koncentracije ekstrakta za vrste *A. paniculatum*, *A. cepa* i ekstrakt nadzemnog dela vrste *A. flavum*

Tabela 8.29. Rezultati DPPH testa za BHT i standard kvercetin

Radna konc. ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancija				DPPH-RSC(%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A _{kor}	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
BHT								
8,33	0,069	0,065	0,062	0,041	84,65	86,83	89,18	86,89
3,33	0,076	0,077	0,077	0,041	80,67	80,24	81,03	80,65
2,50	0,110	0,115	0,111	0,041	62,50	59,63	63,34	61,83
1,67	0,128	0,136	0,138	0,041	52,23	47,97	48,73	49,64
0,83	0,159	0,163	0,165	0,042	35,82	33,77	34,88	34,82
0,42	0,189	0,186	0,185	0,046	21,45	23,00	26,10	23,51
0,21	0,207	0,214	0,199	0,041	9,00	5,23	16,10	10,11
0,10	0,216	0,213	0,212	0,042	5,09	6,83	10,02	7,31
kontrola	0,225	0,225	0,231	0,042				
IC₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)					1,45	1,60	1,56	1,54 \pm 0,06
Kvercetin								
2,23	0,057	0,058	0,057	0,042	91,53	91,05	91,77	91,45
1,49	0,059	0,059	0,059	0,041	90,62	90,24	90,47	90,45
0,74	0,076	0,077	0,065	0,042	81,13	80,60	87,49	83,07
0,37	0,146	0,143	0,146	0,041	42,23	44,15	44,54	43,64
0,19	0,167	0,184	0,164	0,042	31,56	22,17	35,35	29,69
0,09	0,206	0,198	0,204	0,042	10,38	14,53	14,11	13,01
kontrola	0,225	0,225	0,231	0,042				
IC₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)					0,40	0,42	0,38	0,40 \pm 0,01



Grafici 8.19.–8.20. Krive zavisnosti DPPH-RSC od radne koncentracije za BHT i standard kvercetin

Sposobnost hvatanja ABTS^{•+} radikala (ukupna antioksidantna sposobnost)**Tabela 8.30.** Izmerene apsorbancije radnih proba, korekcije i kontrole

Početna koncentracija [mg/mL]	A ₁	A ₂	A ₃	A _{sr}	A _{kor}	A _{kon}
<i>A. sativum</i>						
0,25	0,5300	0,5341	0,5625	0,0154	0,5422	0,5268
0,5	0,4243	0,4444	0,4480	0,0151	0,4389	0,4238
<i>A. cepa</i>						
0,05	0,9606	0,6993	0,9163	0,0234	0,8587	0,8354
0,1	0,6954	0,7264	0,8307	0,0247	0,7509	0,7261
<i>A. carinatum subsp. carinatum, Tara</i>						
0,25	0,7141	0,6605	0,5742	0,0233	0,6496	0,6263
0,5	0,3514	0,5437	0,3570	0,0222	0,4174	0,3951
<i>A. carinatum subsp. carinatum, Čemernik</i>						
0,25	/	0,7146	/	0,0227	0,7146	0,6920
0,5	0,5285	0,6144	0,4134	0,0237	0,5188	0,4951
<i>A. capinatum subsp. pulchellum, Tara</i>						
0,25	0,4721	0,5132	/	0,0436	0,4926	0,4490
0,5	0,4554	0,3863	0,7043	0,0269	0,5153	0,4884
<i>A. capinatum subsp. pulchellum, Vlasinsko jezero</i>						
0,25	0,7189	0,7381	/	0,0238	0,7285	0,7047
0,5	0,5803	0,5674	/	0,0239	0,5738	0,5499
<i>A. flavum, Bačka palanka</i>						
0,25	0,7679	0,8689	0,7868	0,0240	0,8278	0,8039
0,5	0,5496	0,6633	0,5625	0,0339	0,5918	0,5580
<i>A. flavum, Babušnica, herba</i>						
0,1	0,6052	0,4902	0,7793	0,0257	0,6249	0,5992
0,25	0,3351	0,3689	0,3742	0,0264	0,3716	0,3451
<i>A. flavum, Babušnica</i>						
0,25	0,7516	0,7005	0,7674	0,0424	0,7398	0,6974
0,5	0,5043	0,5395	0,5301	0,0434	0,5246	0,4813
<i>A. flavum, Vršачki breg</i>						
0,25	/	/	0,7161	0,0263	0,7161	0,6898
0,5	0,4952	0,4309	0,4526	0,0323	0,3997	0,3675
<i>A. flavum, Mokra gora</i>						
0,25	0,6268	0,6032	0,6138	0,0452	0,6146	0,5694
0,5	0,4984	0,4895	0,4887	0,0445	0,4922	0,4477
<i>A. flavum, Klisura Jerme</i>						
0,25	0,6698	0,7784	0,8290	0,0254	0,7590	0,7337
0,5	0,5836	0,6074	0,4405	0,0211	0,5438	0,5227
<i>A. fuscum, Beli rzav</i>						
0,25	/	0,5483	0,8278	0,0258	0,6881	0,6623
0,5	0,3356	0,2663	0,2559	0,0223	0,2859	0,2636

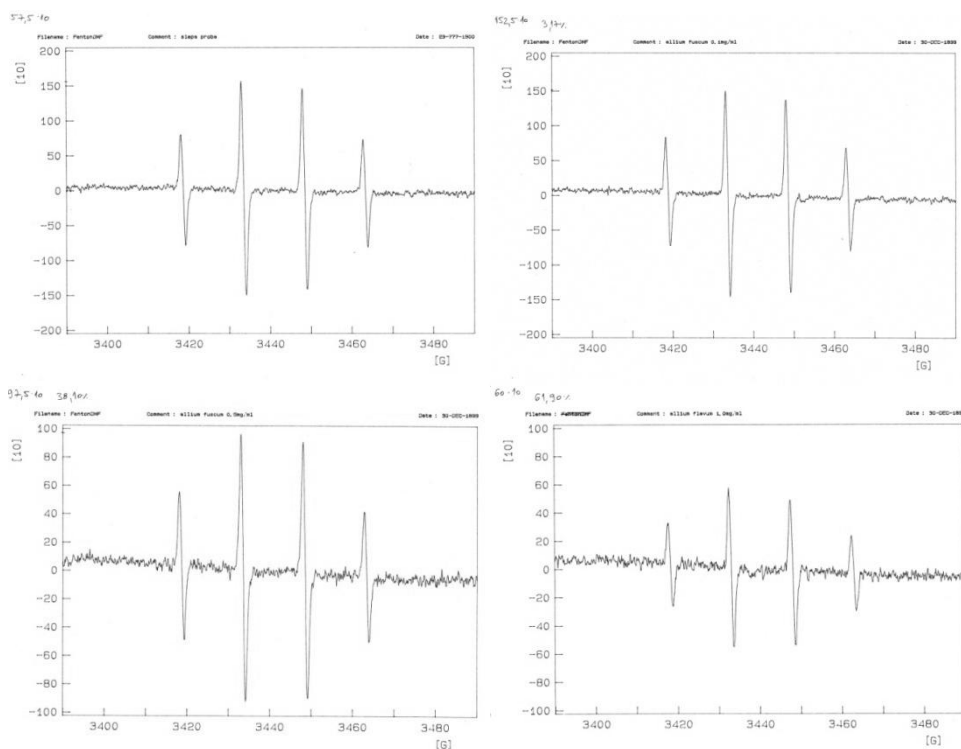
Tabela 8.31. Izračunate vrednosti ukupne aktioksidantne sposobnosti ekstrakata (TAS)

Početna koncentracija ekstrakta [mg/mL]	mmol Troloxa L ⁻¹	mmol Trolox ekv, g ⁻¹ s, e,	TAS [mmol Trolox ekv, g ⁻¹ s, e,]
<i>A. sativum</i> , Šajkaš			
0,25	0,9331	0,3732	0,3309
0,5	1,4425	0,2885	
<i>A. cepa</i> , Neradin			
0,05	0,7500	1,4999	1,3679
0,1	1,2359	1,2359	
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i> , Tara			
0,25	1,3310	0,5324	0,4952
0,5	2,2898	0,4580	
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i> , Čemernik			
0,25	1,0585	0,4234	0,3992
0,5	1,8750	0,3750	
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchellum</i> , Tara			
0,25	1,8866	0,7546	0,6067
0,5	2,2939	0,4588	
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchellum</i> , Vlasinsko jezero			
0,25	1,0057	0,4023	0,3659
0,5	1,6480	0,3296	
<i>A. flavum</i> , Bela Palanka			
0,25	0,8900	0,3560	0,3394
0,5	1,6144	0,3229	
<i>A. flavum</i> , Babušnica, herba			
0,1	1,8008	1,8008	1,4867
0,25	2,9313	1,1725	
<i>A. flavum</i> , Babušnica			
0,25	0,8991	0,3597	0,3557
0,5	1,7583	0,3517	
<i>A. flavum</i> , Vršački breg			
0,25	1,3977	0,5591	0,5200
0,5	2,4047	0,4809	
<i>A. flavum</i> , Mokra gora			
0,25	1,4081	0,5633	0,4708
0,5	1,8918	0,3784	
<i>A. flavum</i> , Klisura Jerme			
0,25	1,2025	0,4810	0,4165
0,5	1,7606	0,3521	
<i>A. fuscum</i> , Beli rzav			
0,25	1,5201	0,6081	0,5876
0,5	2,8354	0,5671	
<i>A. fuscum</i> , Zaovine			
0,25	1,2994	0,5198	0,4369
0,5	1,7700	0,3540	
<i>A. fuscum</i> , Derventa			
0,1	0,6788	0,6788	0,6802
0,25	1,7040	0,6816	

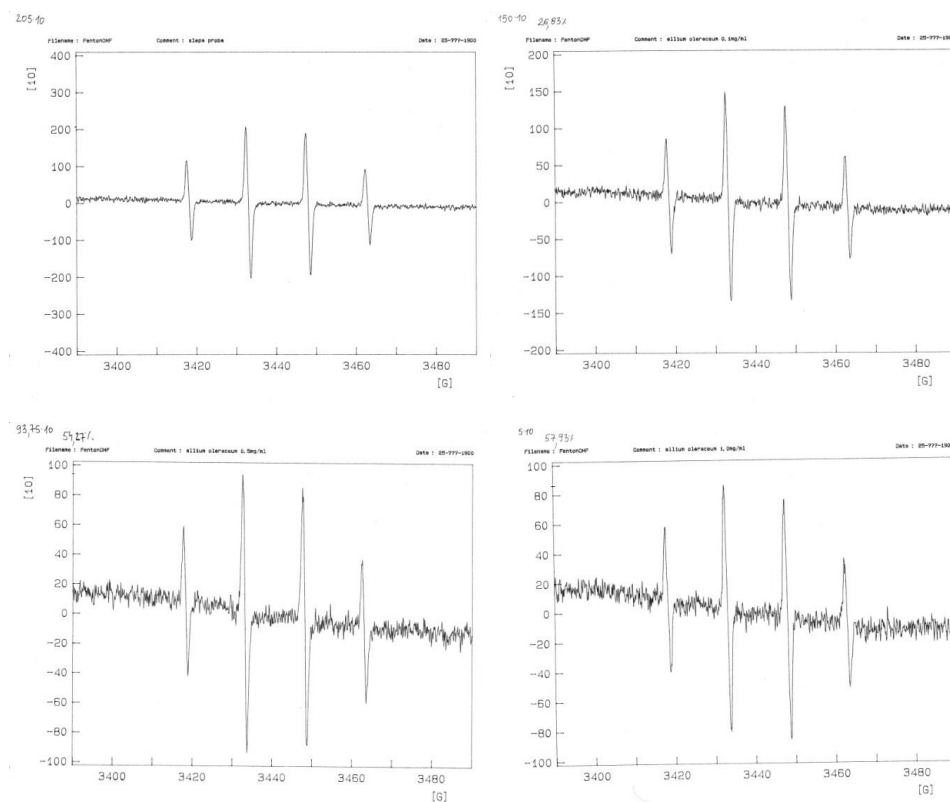
Početna koncentracija ekstrakta [mg/mL]	mmol Troloxa L ⁻¹	mmol Trolox ekv, g ⁻¹ s, e,	TAS [mmol Trolox ekv, g ⁻¹ s, e,]
<i>A. paniculatum</i> , Titelski breg			
0,25	1,5613	0,6245	0,6029
0,5	2,9064	0,5813	
<i>A. melanatherum</i> , Plana			
0,25	1,2292	0,4917	0,4823
0,5	2,3649	0,4730	
<i>A. melanatherum</i> , Čemernik			
0,25	1,4308	0,5723	0,4975
0,5	2,1136	0,4227	
<i>A. pallens</i> , Beli Rzav			
0,25	1,1378	0,4551	0,3972
0,5	1,6965	0,3393	
<i>A. rhodopeum</i> , Dimitrovgrad			
0,25	0,6733	0,2693	0,2789
0,5	1,4422	0,2884	
<i>A. olearaceum</i> , Kosmovac			
0,25	1,5253	0,6101	0,5321
0,5	2,2705	0,4541	

Sposobnost hvatanja hidroksil radikala određena ESR-metodom

A. flavum subsp. *flavum*, Babušnica

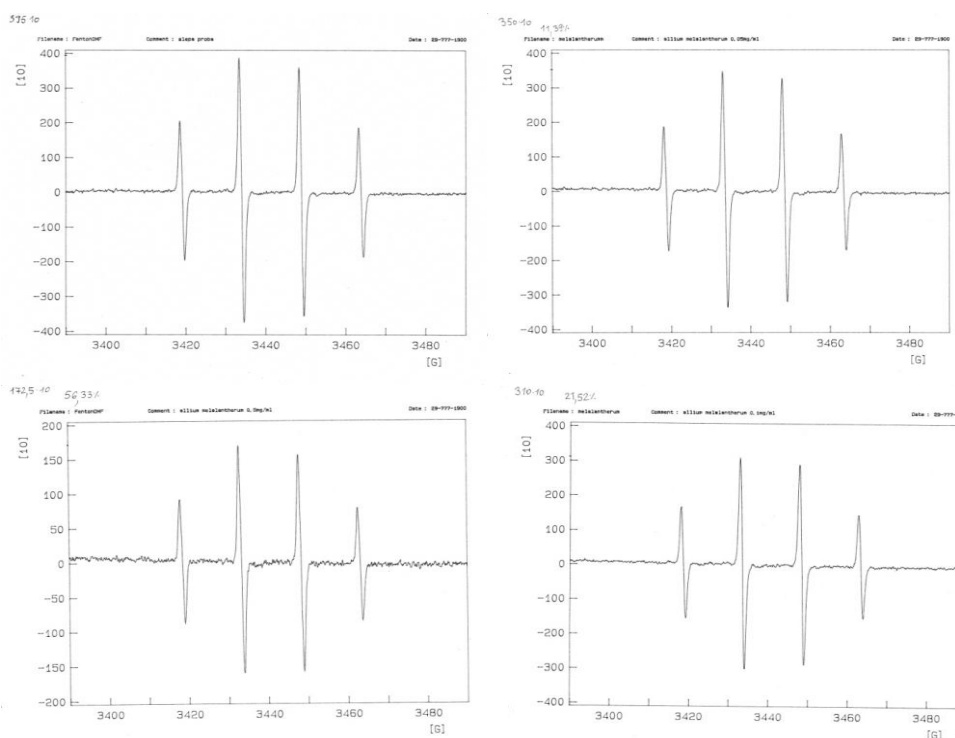


A. olearaceum, Kosmovac

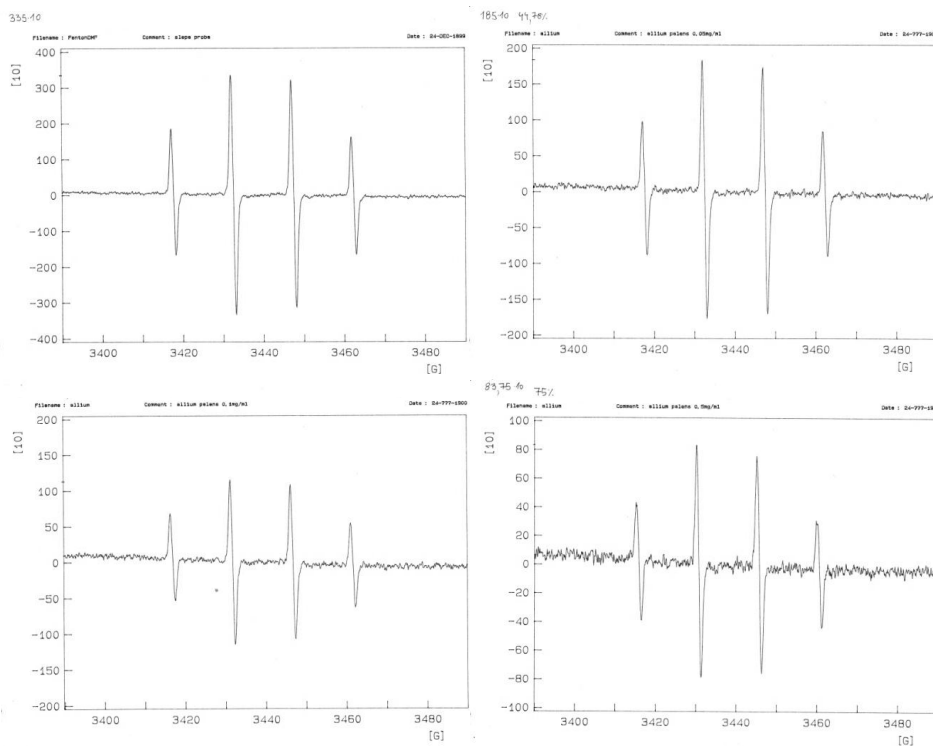


Slika 8.42. ESR spektri za vrste *A. flavum* subsp. *flavum* (Babušnica) i *A. olearaceum* (Kosmovac)

A. melanantherum, Plana

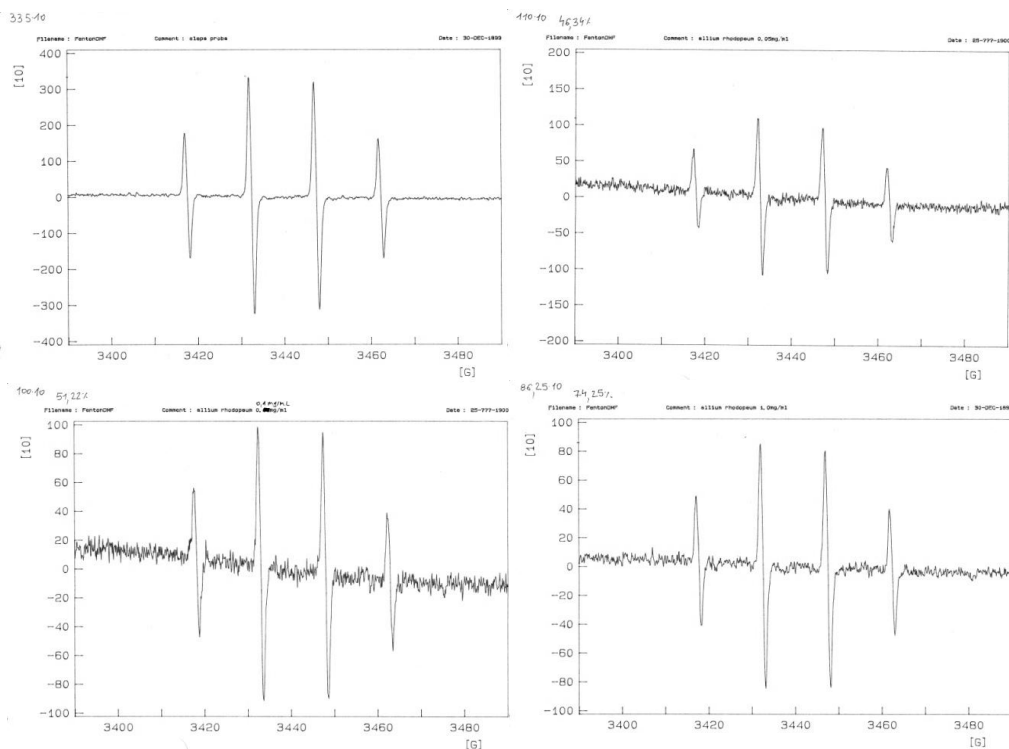


A. pallens, Beli Rzav

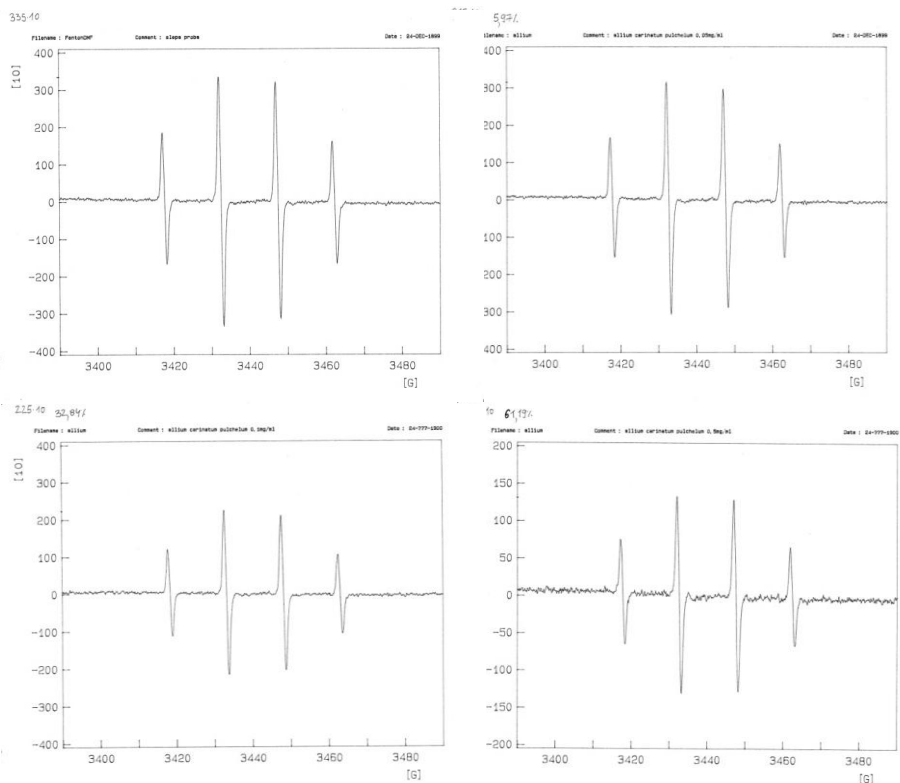


Slika 8.43. ESR spektri za vrste *A. melanantherum* (Plana) i *A. pallens* (Beli Rzav)

A. rhodopeum, Dimitrovgrad

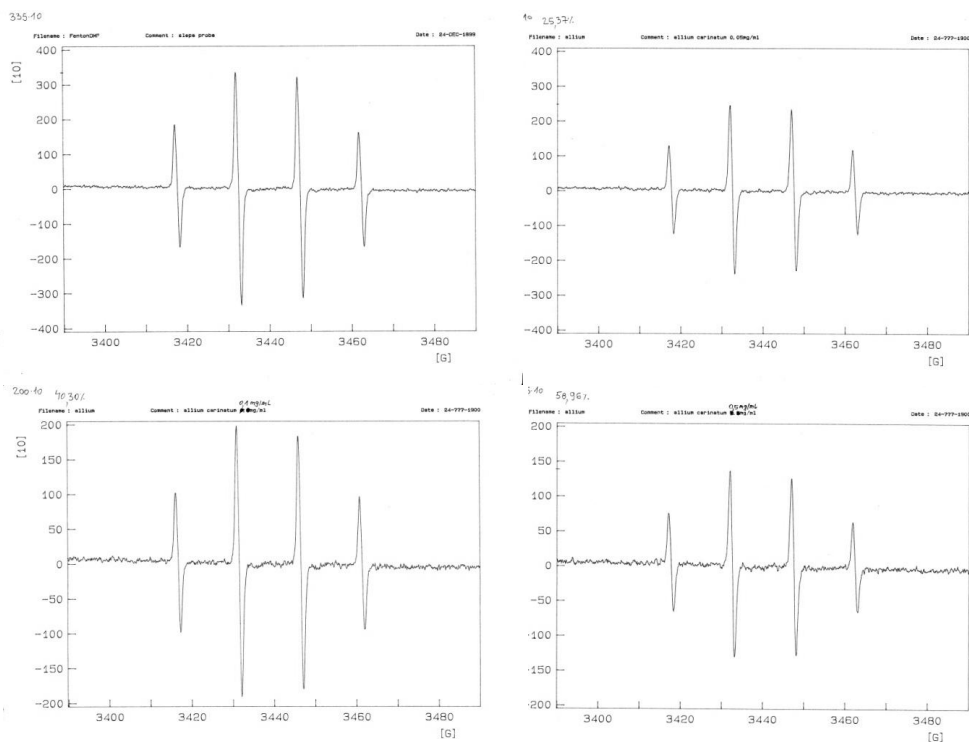


A. carinatum subsp. *pulchelum*, Vlasinsko jezero

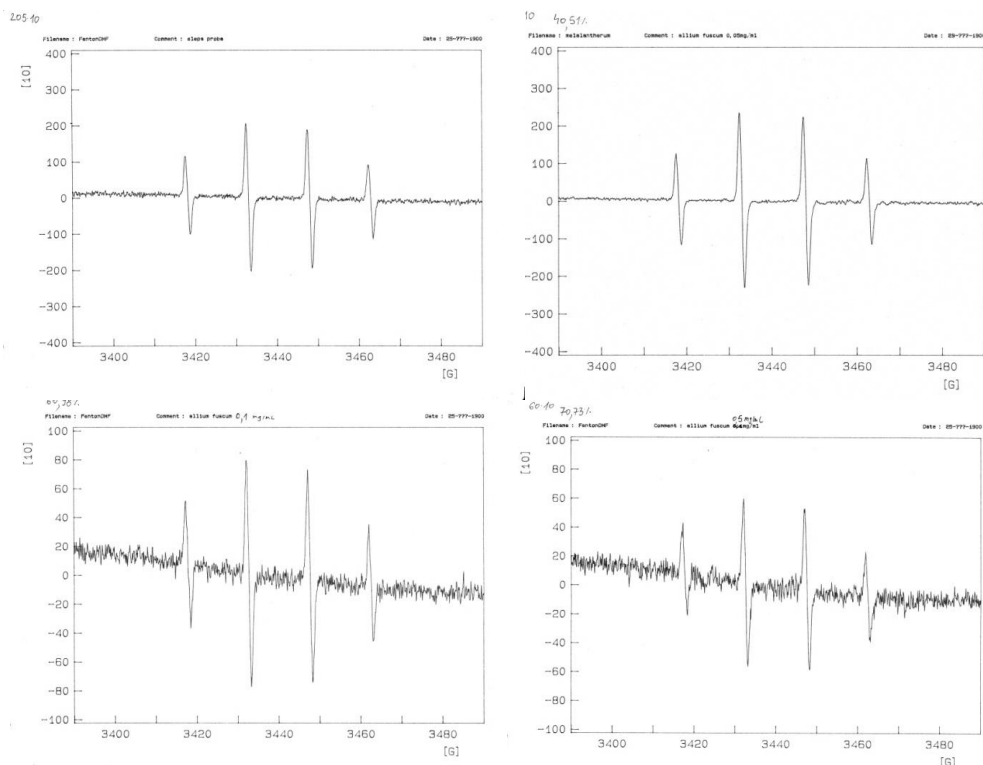


Slika 8.44. ESR spektri za vrste *A. rhodopeum* (Dimitrovgrad) i *A. carinatum* subsp. *pulchelum* (Vlasinsko jezero)

A. carinatum subsp. *carinatum*, Čemernik

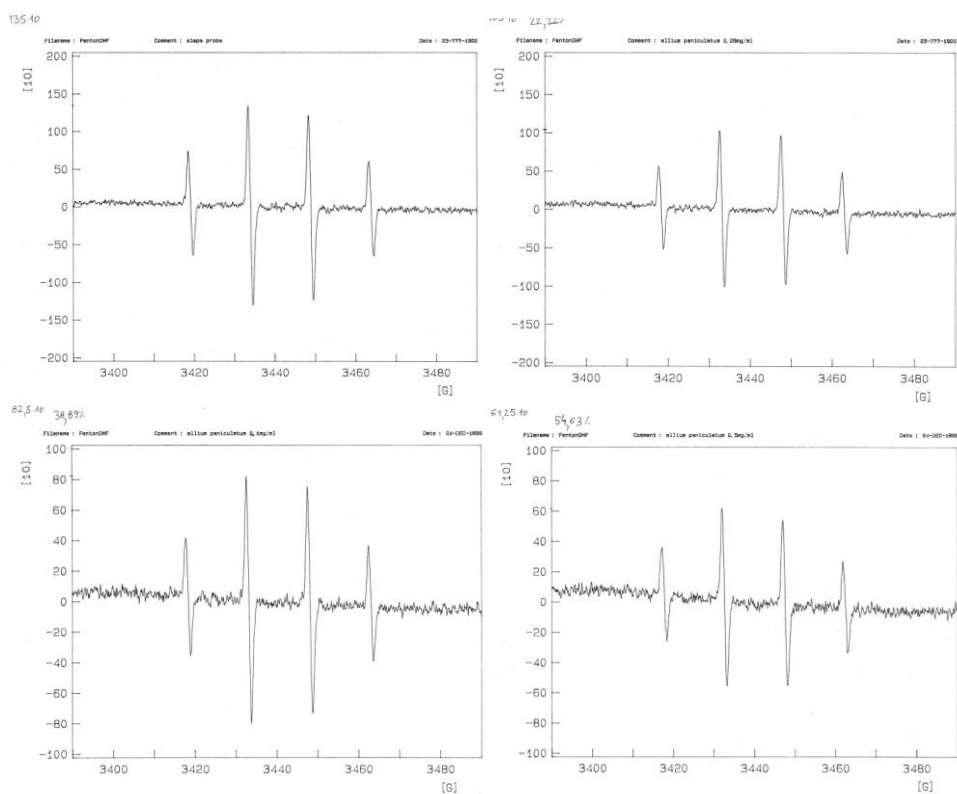


A. fuscum subsp. *fuscum*, Zaovine

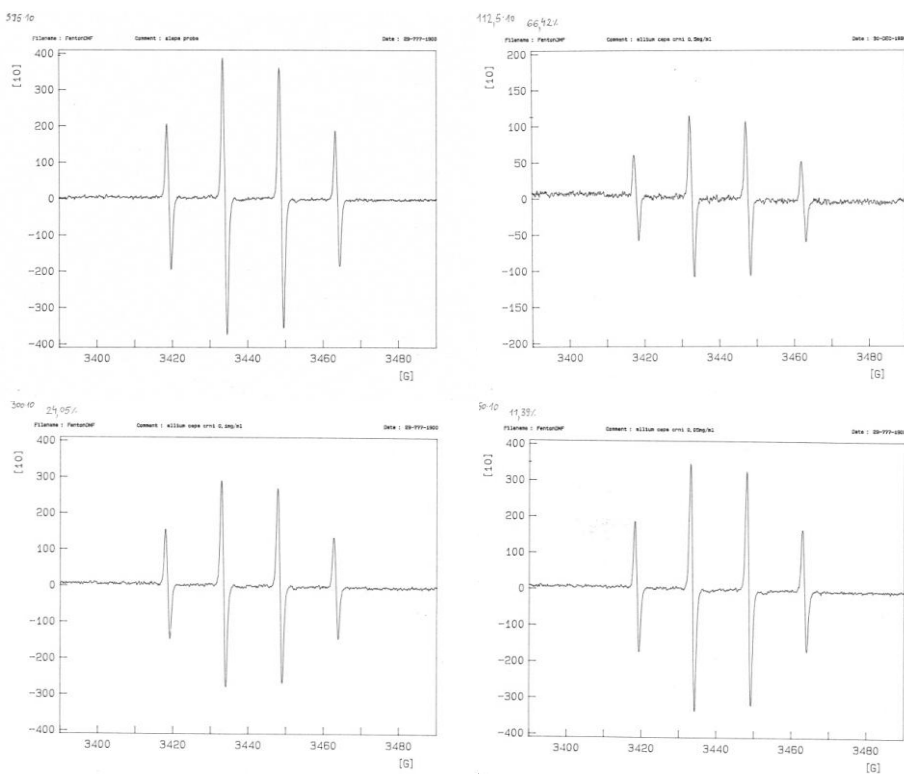


Slika 8.45. ESR spektri za vrste *A. carinatum* subsp. *carinatum* (Čemernik) i *A. fuscum* var. *fuscum* (Zaovine)

A. paniculatum subsp. *marginatum*, Titelski breg



A. cepa, Neradin

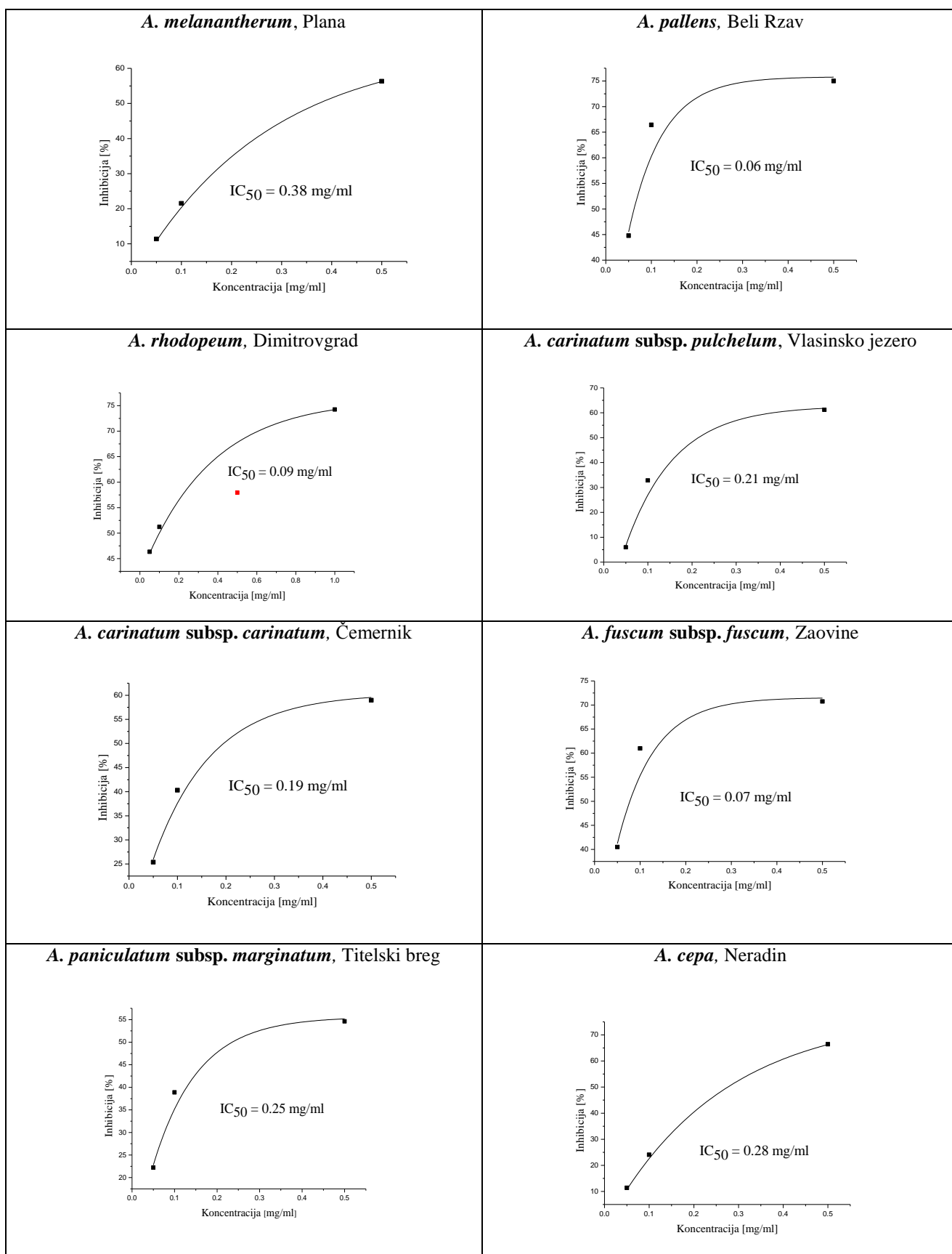


Slika 8.46. ESR spektri za vrste *A. paniculatum* (Titelski breg) i *A. cepa* (Neradin)

Tabela 8.32. Vrednosti OH[•]-RSC izračunate iz ESR spektara i IC₅₀ vredosti očitane iz krivih zavisnosti OH[•]-RSC od radne koncentracije ekstrakata

Ekstrakt	Radna koncentracija ekstrakta [mg/mL]	OH [•] -RSC [%]	IC ₅₀ [mg/mL]
<i>A. flavum</i> subsp. <i>flavum</i> , Babušnička reka	0,1	3,17	0,72
	0,5	38,1	
	1,0	61,9	
<i>A. olearaceum</i> , Kosmovac	0,1	26,8	0,35
	0,5	54,3	
	1,0	57,9	
<i>A. melanantherum</i> , Plana	0,05	11,4	0,38
	0,1	21,5	
	0,5	56,3	
<i>A. pallens</i> , Beli Rzav	0,05	44,8	0,06
	0,1	66,4	
	0,5	75,0	
<i>A. rhodopeum</i> , Dimitrovgrad	0,05	46,3	0,09
	0,1	51,2	
	0,5	57,9	
	1,0	74,2	
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchelum</i> , Vlasinsko jezero	0,05	6,0	0,21
	0,1	32,8	
	0,5	61,2	
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i> , Čemernik	0,05	25,4	0,19
	0,1	40,3	
	0,5	60,0	
<i>A. fuscum</i> subsp. <i>fuscum</i> , Zaovine	0,05	40,5	0,07
	0,1	61,0	
	0,5	70,7	
<i>A. paniculatum</i> subsp. <i>marginatum</i> , Titelski breg	0,05	22,2	0,25
	0,1	38,9	
	0,5	54,6	
<i>A. cepa</i> , Neradin	0,05	11,4	0,28
	0,1	24,0	
	0,5	66,4	

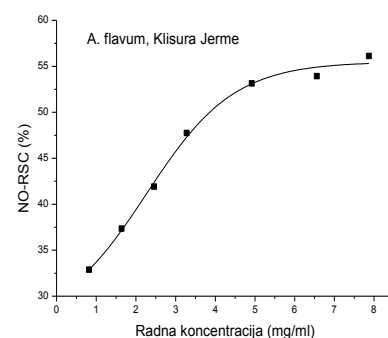
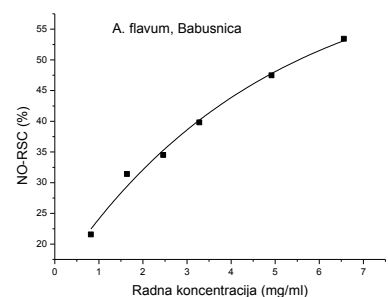
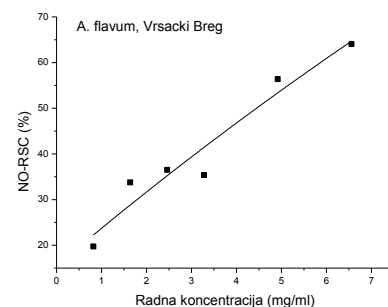
Tabela 8.33. Krive zavisnosti OH-RSC od radne koncentracije ekstrakta



Kapacitet hvatanja NO radikala (NO-RSC)

Tabela 8.34. Rezultati NO testa za ekstrakte vrste *A.flavum* sa različitih lokaliteta

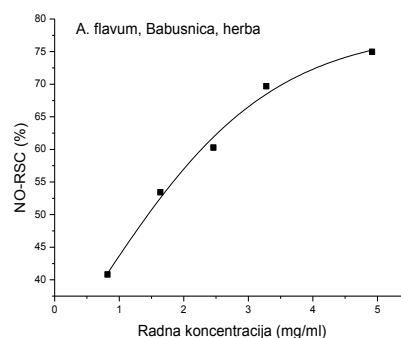
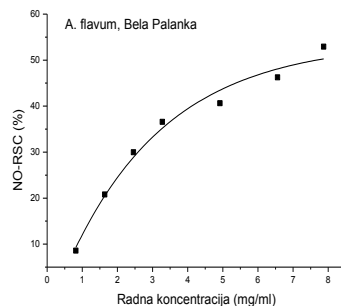
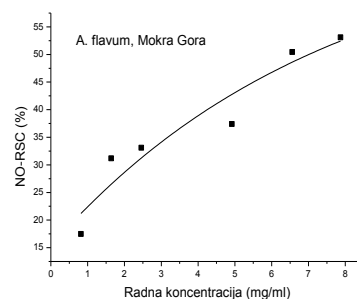
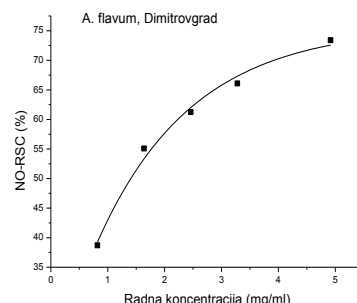
Radna konc, (mg/ml)	Absorbancija				NO-RSC (%)			
	A-1	A-2	A-3	A _{kor}	RSC-1	RSC-2	RSC-3	Srednja vrednost
<i>A. flavum</i>, Vršački breg								
0,820	0,313	0,273	0,292	0,063	12,59	26,75	19,83	19,72
1,639	0,278	0,254	0,281	0,082	31,40	39,55	30,30	33,75
2,459	0,351	0,291	0,290	0,129	22,42	43,29	43,82	36,51
3,279	0,374	0,336	0,312	0,158	24,51	37,71	46,24	36,15
4,918	0,344	0,353	0,344	0,222	57,56	54,14	57,46	56,39
6,557	0,423	0,407	0,431	0,318	62,99	68,79	60,42	64,07
kontrola	0,241	0,280	0,256	0,043				
IC ₅₀ (mg/ml)					4,52	3,61	3,52	3,88 ± 0,55
<i>A. flavum</i>, Babušnica								
0,820	0,339	0,323	0,326	0,059	18,71	23,41	22,59	21,57
1,639	0,334	0,302	0,299	0,076	24,95	34,23	35,03	31,40
2,459	0,336	0,329	0,327	0,106	33,03	34,94	35,55	34,51
3,279	0,349	0,330	0,321	0,126	35,38	40,74	43,30	39,81
4,918	0,379	0,393	0,361	0,197	46,98	43,15	52,32	47,48
6,557	0,436	0,420	0,463	0,268	51,15	55,72	43,28	53,43
kontrola	0,414	0,385	0,384	0,046				
IC ₅₀ (mg/ml)					6,02	5,59	4,49	5,37 ± 0,79
<i>A. flavum</i>, Klisura Jerme								
0,820	0,250	0,256	0,258	0,062	34,41	32,42	31,81	32,88
1,639	0,266	0,230	0,247	0,069	31,47	43,71	38,03	34,75
2,459	0,251	0,243	0,232	0,080	40,43	43,34	47,18	43,65
3,279	0,258	0,250	0,256	0,110	48,60	51,44	49,29	49,78
4,918	0,269	0,262	0,273	0,134	53,13	55,61	51,55	53,43
6,557	0,328	0,300	0,293	0,164	42,95	52,81	55,05	53,93
7,869	0,314	0,317	0,349	0,189	56,56	55,69	44,44	56,12
kontrola	0,341	0,342	0,328	0,047				
IC ₅₀ (mg/ml)					3,39	3,21	3,33	3,31 ± 0,09



Grafici 8.21.–8.23. Krive zavisnosti NO-RSC od radne koncentracije ekstrakta za vrste *A. flavum* sa različitih lokaliteta

Tabela 8.35. Rezultati NO testa za ekstrakte vrsta *A.flavum* sa različitih lokaliteta

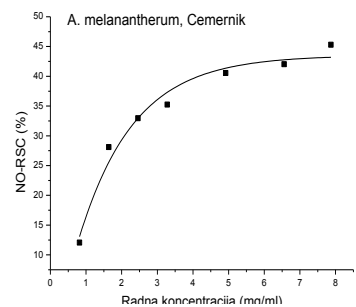
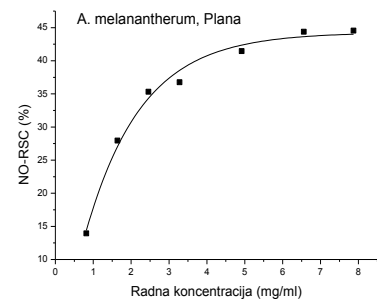
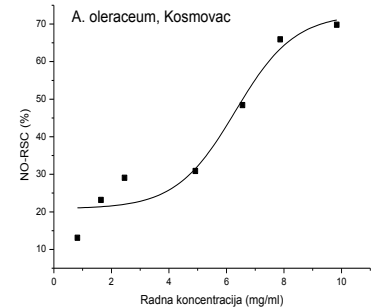
Radna konc. (mg/ml)	Absorbancija				NO-RSC (%)			Srednja Vrednost
	A-1	A-2	A-3	A _{kor}	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>A. flavum</i>, Dimitrovgrad								
0,820	0,291	0,303	0,306	0,096	41,40	37,80	36,88	38,70
1,639	0,291	0,291	0,304	0,148	57,05	57,07	53,12	55,08
2,459	0,332	0,343	0,335	0,207	62,64	59,30	61,80	61,25
3,279	0,369	0,366	0,360	0,252	64,90	65,68	67,69	66,09
4,918	0,437	0,429	0,420	0,340	70,79	73,36	76,02	73,39
kontrola	0,377	0,384	0,389	0,055				
IC ₅₀ (mg/ml)					1,24	1,41	1,50	1,38 ± 0,13
<i>A. flavum</i>, Mokra Gora								
0,820	0,322	0,325	0,314	0,074	16,95	15,97	19,48	17,47
1,639	0,292	0,351	0,294	0,088	31,53	11,78	30,82	31,17
2,459	0,309	0,304	0,303	0,105	31,82	33,49	34,02	33,11
4,918	0,317	0,319	0,326	0,133	38,67	38,05	35,49	37,40
6,557	0,352	0,370	0,341	0,206	51,22	45,27	54,86	50,45
7,869	0,395	0,375	0,387	0,246				
kontrola	0,341	0,385	0,322	0,053				
IC ₅₀ (mg/ml)					7,75	6,94	5,15	6,61 ± 1,33
<i>A. flavum</i>, Bela Palanka								
0,820	0,258	0,329	0,316	0,054	30,35	6,47	10,70	8,59
1,639	0,294	0,304	0,270	0,056	19,27	15,62	27,44	20,78
2,459	0,271	0,291	0,262	0,069	31,29	24,27	34,31	29,96
3,279	0,255	0,288	0,260	0,082	40,84	29,65	39,30	36,59
4,918	0,266	0,284	0,275	0,101	43,65	37,63	40,60	40,62
6,557	0,320	0,309	0,303	0,148	44,65	45,27	47,22	46,25
7,869	0,340	0,341	0,332	0,199	52,11	51,65	55,00	52,92
kontrola	0,359	0,340	0,316	0,044				
IC ₅₀ (mg/ml)					6,82	7,70	7,32	7,28 ± 0,44
<i>A. flavum</i>, Babušnica, herba								
0,820	0,318	0,322	0,310	0,131	40,38	39,04	43,02	40,81
1,639	0,357	0,361	0,367	0,215	54,91	53,66	51,74	53,43
2,459	0,408	0,432	0,416	0,294	63,69	56,02	61,11	60,27
3,279	0,468	0,459	0,461	0,368	67,97	70,92	70,14	69,68
4,918	0,653	0,662	0,570	0,579	76,43	73,49	70,76	74,96
kontrola	0,367	0,392	0,333	0,065				
IC ₅₀ (mg/ml)					1,34	1,59	1,46	1,46 ± 0,12



Grafici 8.24.–8.27. Krive zavisnosti NO-RSC od radne koncentracije ekstrakta za vrste *A. flavum* sa različitih lokaliteta

Tabela 8.36. Rezultati NO testa za ekstrakte vrsta *A.oleraceum* i *A. melanantherum* sa različitih lokaliteta

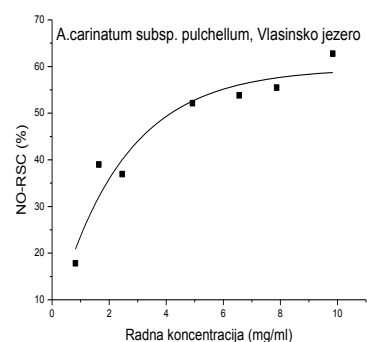
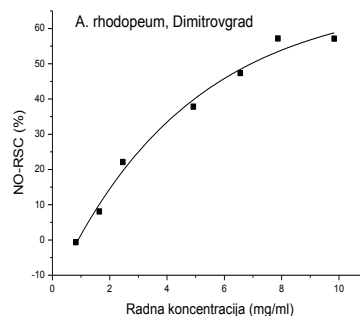
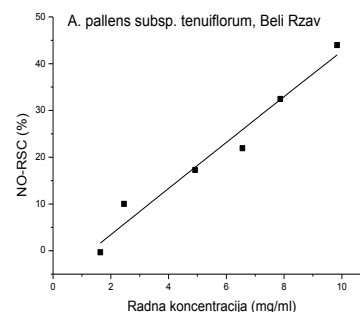
Radna konc, (mg/ml)	Absorbancija				NO-RSC (%)			
	A-1	A-2	A-3	A _{kor}	RSC-1	RSC-2	RSC-3	Srednja vrednost
<i>A.oleraceum</i>, Kosmovac								
0,820	0,270	0,294	0,284	0,099	19,23	7,54	12,57	13,11
1,639	0,275	0,263	0,263	0,105	19,46	25,12	24,90	23,16
2,459	0,301	0,315	0,310	0,159	32,70	26,09	28,46	29,08
4,918	0,342	0,404	0,407	0,260	61,22	31,68	30,06	30,87
6,557	0,398	0,362	0,497	0,271	39,88	56,93	7,23	48,40
7,869	0,509	0,490	0,481	0,421	58,51	67,65	71,57	65,91
9,836	0,440	0,561	0,586	0,510	133,20	75,77	63,82	69,80
kontrola	0,264	0,257	0,264	0,051				
IC ₅₀ (mg/ml)					7,30	6,14	5,29	6,24 ±1,01
<i>A. melanantherum</i>, Plana								
0,820	0,334	0,325	0,326	0,053	12,04	15,03	14,76	13,94
1,639	0,299	0,290	0,282	0,060	25,15	28,01	30,68	27,95
2,459	0,276	0,279	0,272	0,069	35,35	34,16	36,46	35,32
3,279	0,274	0,274	0,271	0,071	36,36	36,55	37,37	36,76
4,918	0,279	0,285	0,288	0,097	42,99	41,09	40,27	41,45
6,557	0,310	0,303	0,314	0,131	44,05	46,35	42,78	44,39
7,869	0,304	0,346	0,331	0,1496	51,67	38,56	43,42	44,55
kontrola	0,370	0,366	0,359	0,045				
IC ₅₀ (mg/ml)					n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
<i>A. melanantherum</i>, Čemernik								
0,820	0,348	0,354	0,350	0,052	12,04	15,03	14,76	13,94
1,639	0,320	0,303	0,328	0,072	25,15	28,01	30,68	27,95
2,459	0,301	0,304	0,306	0,076	35,35	34,16	36,46	35,32
3,279	0,292	0,302	0,302	0,079	36,36	36,55	37,37	36,76
4,918	0,320	0,309	0,311	0,111	42,99	41,09	40,27	41,45
6,557	0,335	0,323	0,329	0,132	44,05	46,35	42,78	44,39
7,869	0,343	0,340	0,347	0,157	51,67	38,56	43,42	44,55
kontrola	0,370	0,366	0,359	0,045				
IC ₅₀ (mg/ml)					n. d.	n. d.	n. d.	n. d.



Grafici 8.27.–8.29. Krive zavisnosti NO-RSC od radne koncentracije ekstrakta za vrste *A.oleraceum* i *A. melanantherum* sa različitih lokaliteta

Tabela 8.37. Rezultati NO testa za ekstrakte vrsta *A. pallens*, *A. rhodopeum* i *A. carinatum* subsp. *pulcellum*

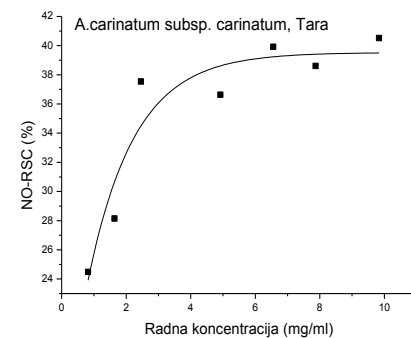
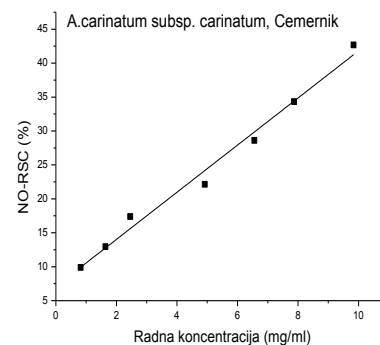
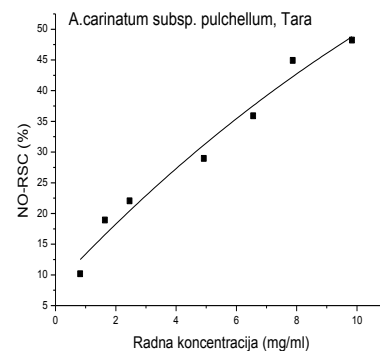
Radna konc. (mg/ml)	Absorbancija				NO-RSC (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A _{kor}	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>A. pallens</i> subsp. <i>tenuiflorum</i>, Beli Rzav								
1,639	0,292	0,299	0,302	0,097	2,52	0,00	0,00	0,84
2,459	0,290	0,297	0,293	0,114	11,65	8,11	10,25	10,00
4,918	0,305	0,305	0,315	0,143	18,64	19,09	14,11	17,28
6,557	0,313	0,324	0,338	0,169	27,87	22,40	15,42	21,90
7,869	0,312	0,345	0,361	0,204	46,23	29,63	21,48	32,44
9,836	0,349	0,383	0,352	0,249	50,25	33,04	48,63	43,98
kontrola	0,237	0,241	0,267	0,048				
IC ₅₀ (mg/ml)					n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
<i>A. rhodopeum</i>, Dimitrovgrad								
0,820	0,275	0,266	0,259	0,067	0,00	0,00	3,39	1,13
1,639	0,271	0,261	0,239	0,074	1,04	6,24	16,96	8,08
2,459	0,225	0,249	0,244	0,084	29,29	17,26	19,76	22,10
4,918	0,234	0,227	0,219	0,103	34,24	37,54	41,70	37,82
6,557	0,240	0,223	0,222	0,124	41,44	50,13	50,45	47,34
7,869	0,230	0,236	0,228	0,146	57,68	54,88	58,88	57,15
9,836	0,265	0,238	0,251	0,159	46,84	60,24	54,01	57,13
kontrola	0,258	0,241	0,263	0,055				
IC ₅₀ (mg/ml)					7,00	6,92	6,64	6,85±0,19
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulcellum</i>, Vlasinsko jezero								
0,820	0,253	0,276	0,266	0,066	22,65	13,19	17,58	17,81
1,639	0,262	0,283	0,238	0,113	38,56	29,96	48,41	38,98
2,459	0,271	0,293	0,280	0,128	41,18	32,03	37,55	36,92
4,918	0,347	0,351	0,339	0,229	51,56	49,98	54,85	52,13
6,557	0,391	0,386	0,396	0,279	53,74	56,05	51,67	53,82
7,869	0,448	0,439	0,333	0,336	53,74	57,21	40,89	55,48
kontrola	0,290	0,285	0,303	0,050				
IC ₅₀ (mg/ml)					5,19	4,87	4,49	4,85±0,35



Grafici 8.30.–8.33. Krive zavisnosti NO-RSC od radne koncentracije ekstrakta za vrste *A. pallens*, *A. rhodopeum* i *A. carinatum* subsp. *pulcellum*

Tabela 8.38. Rezultati NO testa za ekstrakte podvrsta *A. carinatum* subsp. *pulchellum* i *A. carinatum* subsp. *carinatum*

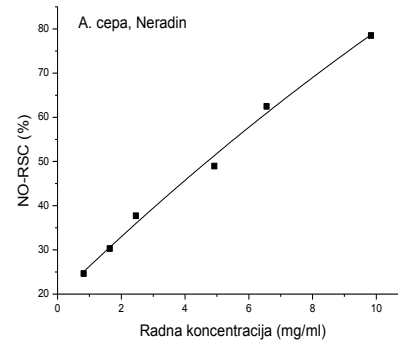
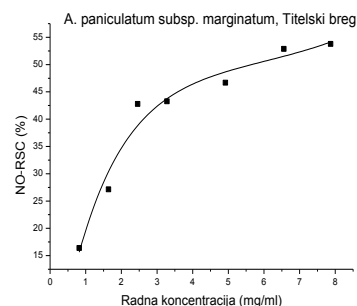
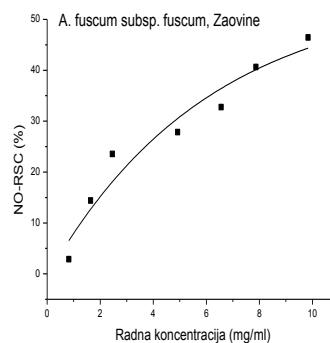
Radna konc, (mg/ml)	Absorbancija				NO-RSC (%)			
	A-1	A-2	A-3	A _{kor}	RSC-1	RSC-2	RSC-3	Srednja vrednost
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchellum</i> , Tara								
0,820	0,457	0,467	0,513	0,054	14,80	12,63	3,09	10,17
1,639	0,416	0,476	0,445	0,062	25,14	12,45	19,17	18,92
2,459	0,409	0,430	0,427	0,053	24,81	20,37	20,97	22,05
4,918	0,375	0,402	0,401	0,056	32,68	27,01	27,23	28,97
6,557	0,359	0,393	0,373	0,072	39,25	32,05	36,42	35,91
7,869	0,340	0,351	0,342	0,085	46,12	43,70	45,58	44,91
9,836	0,469	0,441	0,482	0,219	47,09	53,11	44,45	48,22
kontrola	0,493	0,557	0,516	0,049				
IC ₅₀ (mg/ml)					n. d.	9,295	n. d.	n. d.
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i> , Čemernik								
0,820	0,463	0,434	0,511	0,047	11,30	17,46	0,89	9,89
1,639	0,429	0,434	0,513	0,051	19,32	18,28	1,27	12,96
2,459	0,412	0,421	0,480	0,051	22,86	20,95	8,38	17,40
4,918	0,391	0,428	0,434	0,053	27,83	20,00	18,60	22,14
6,557	0,376	0,393	0,401	0,056	31,62	28,06	26,16	28,61
7,869	0,362	0,368	0,379	0,062	36,02	34,59	32,37	34,33
9,836	0,362	0,368	0,360	0,095	42,93	41,63	43,46	42,67
kontrola	0,506	0,469	0,574	0,048				
IC ₅₀ (mg/ml)					n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
<i>A. carinatum</i> subs. <i>carinatum</i> , Tara								
0,820	0,269	0,249	0,275	0,066	22,74	30,23	20,48	24,48
1,639	0,258	0,255	0,257	0,067	27,62	28,76	28,04	28,14
2,459	0,247	0,237	0,257	0,083	37,42	41,39	33,82	37,54
3,279	0,248	0,256	0,244	0,083	37,10	34,07	38,72	36,63
4,918	0,270	0,253	0,256	0,101	35,95	42,44	41,36	39,92
6,557	0,275	0,270	0,272	0,111	37,72	39,57	38,53	38,61
7,869	0,287	0,285	0,300	0,134	41,74	42,73	37,08	40,52
kontrola	0,321	0,318	0,304	0,051				
IC ₅₀ (mg/ml)					n. d.	n. d.	n. d.	n. d.



Grafici 8.33.–8.35. Krive zavisnosti NO-RSC od radne koncentracije ekstrakta za podvrste *A. carinatum* subsp. *pulchellum* i *A. carinatum* subsp. *carinatum*

Tabela 8.39. Rezultati NO testa za ekstrakte vrsta *A. fuscum* var. *fuscum*, *A. paniculatum* i *A. cepa*

Radna konc, (mg/ml)	Absorbancija				NO-RSC (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A _{kor}	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>A. fuscum</i> var. <i>fuscum</i> , Zaovine								
0,820	0,380	0,355	0,356	0,068	-2,58	5,78	5,42	2,87
1,639	0,344	0,350	0,348	0,087	15,55	13,54	14,16	14,42
2,459	0,361	0,346	0,372	0,127	23,14	28,11	19,43	23,56
4,918	0,397	0,432	0,424	0,198	34,76	23,08	25,67	27,84
6,557	0,415	0,429	0,448	0,226	37,85	33,32	27,12	32,76
7,869	0,481	0,479	0,472	0,297	39,44	40,01	42,46	40,64
9,836	0,546	0,557	0,553	0,389	48,48	44,85	46,02	46,45
kontrola	0,354	0,365	0,341	0,050				
IC ₅₀ (mg/ml)					n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
<i>A. paniculatum</i> subsp. <i>marginatum</i> , Titelski Breg								
0,820	0,312	0,346	0,368	0,065	25,31	15,26	8,59	16,39
1,639	0,340	0,363	0,366	0,115	32,14	24,97	24,30	27,14
2,459	0,403	0,397	0,391	0,208	40,95	42,79	44,62	42,79
3,279	0,460	0,440	0,455	0,264	40,72	46,87	42,24	43,27
4,918	0,465	0,523	0,569	0,369	71,19	53,70	39,65	46,68
6,557	0,711	0,744	0,742	0,576	59,34	49,32	49,94	52,87
7,869	0,931	0,949	0,953	0,792	57,74	52,30	51,31	53,78
kontrola	0,395	0,368	0,361	0,044				
IC ₅₀ (mg/ml)					4,59	4,57	7,64	4,58 ± 0,01
<i>A. cepa</i> , Neradin								
0,820	0,352	0,332	0,329	0,078	20,54	26,35	27,02	24,64
1,639	0,354	0,312	0,309	0,085	21,86	34,02	35,04	30,31
2,459	0,380	0,313	0,311	0,121	24,50	44,13	44,53	37,72
4,918	0,404	0,390	0,396	0,221	46,86	50,92	49,09	48,96
6,557	0,415	0,497	0,455	0,306	68,30	44,61	56,67	62,49
9,836	0,669	0,685	0,697	0,610	82,79	78,10	74,61	78,50
kontrola	0,435	0,357	0,389	0,050				
IC ₅₀ (mg/ml)					5,14	4,20	4,73	4,69 ± 0,47

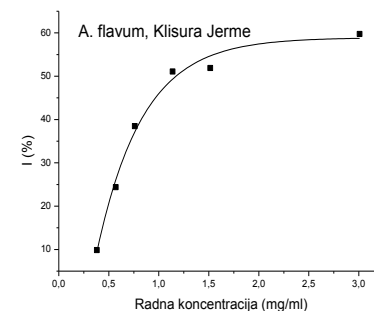
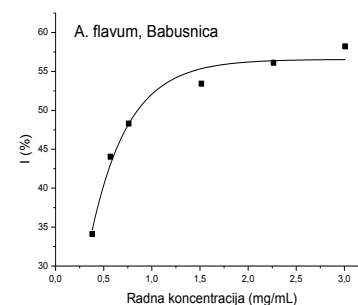
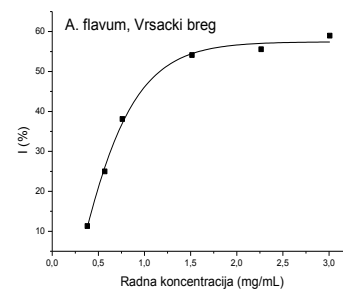


Grafici 8.36.–8.38. Krive zavisnosti NO-RSC od radne koncentracije ekstrakta za vrste *A. fuscum* var. *fuscum*, *A. paniculatum* i *A. cepa*

Sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije (LP)

Tabela 8.40. Rezultati LP testa za ekstrakte vrste *A. flavum* sa različitih lokaliteta

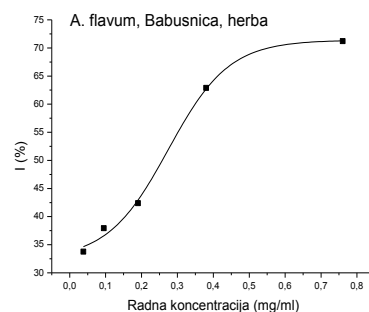
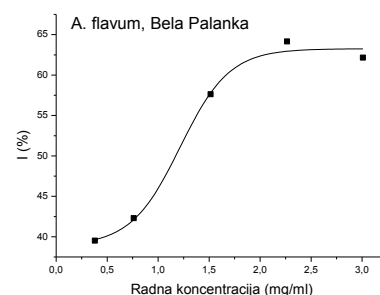
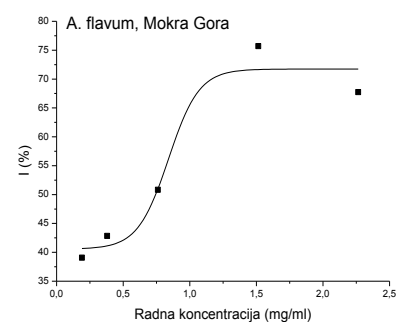
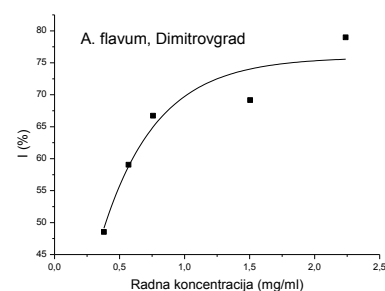
Radna konc. (mg/ml)	Absorbancija				I (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A _{kor}	I-1	I-2	I-3	
<i>A. flavum</i> , Vršački breg								
0,380	0,251	0,224	0,256	0,062	12,55	26,58	10,03	11,29
0,569	0,237	0,255	0,217	0,074	24,84	16,23	33,87	24,98
0,760	0,211	0,230	0,230	0,090	44,06	35,04	35,22	38,11
1,515	0,239	0,274	0,247	0,144	55,89	39,95	52,31	54,10
2,264	0,275	0,290	0,287	0,188	59,69	52,87	54,12	55,56
3,008	0,321	0,356	0,354	0,232	58,96	42,85	45,05	58,96
kontrola	0,241	0,280	0,256	0,043				
IC ₅₀ (mg/ml)					0,844	1,118	1,230	1,06 ± 0,198
<i>A. flavum</i> , Babusnica								
0,380	0,214	0,224	0,203	0,059	34,04	29,67	38,59	34,10
0,569	0,208	0,208	0,204	0,075	43,46	43,34	45,30	44,03
0,760	0,213	0,205	0,187	0,088	46,42	50,15	57,89	48,29
1,515	0,258	0,243	0,238	0,131	45,86	52,35	54,49	53,42
2,264	0,291	0,301	0,274	0,186	54,98	50,89	62,48	56,12
3,008	0,342	0,323	0,322	0,224	49,90	57,86	58,57	58,21
kontrola	0,251	0,283	0,323	0,051				
IC ₅₀ (mg/ml)					0,811	0,759	0,764	0,778 ± 0,029
<i>A. flavum</i> , Klisura Jerme								
0,380	0,294	0,302	0,305	0,065	12,23	9,27	8,03	9,84
0,569	0,267	0,264	0,286	0,075	26,62	27,43	19,12	24,39
0,760	0,261	0,241	0,228	0,090	34,73	42,20	47,18	38,47
1,139	0,263	0,268	0,270	0,140	52,72	50,57	49,91	51,07
1,515	0,281	0,302	0,285	0,164	54,95	47,12	53,60	51,89
3,008	0,419	0,394	0,410	0,303	55,60	64,85	58,80	59,75
kontrola	0,307	0,279	0,343	0,049	12,23	9,27	8,03	9,84
IC ₅₀ (mg/ml)					1,087	1,130	1,179	1,13 ± 0,046



Grafici 8.39.–8.41. Krive zavisnosti inhibicije LP od radne koncentracije ekstrakta za vrstu *A. flavum* sa različitih lokaliteta

Tabela 8.41. Rezultati LP testa za ekstrakte vrste *A. flavum* sa različitih lokaliteta

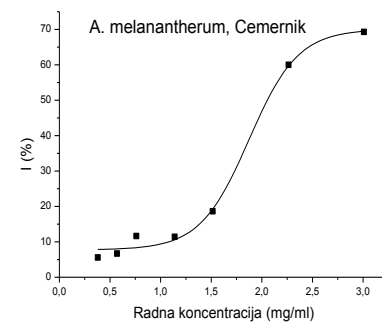
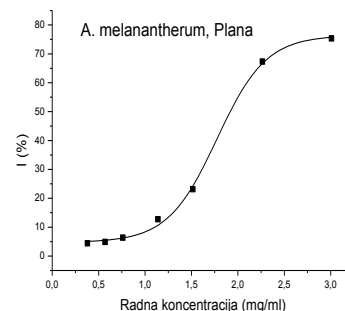
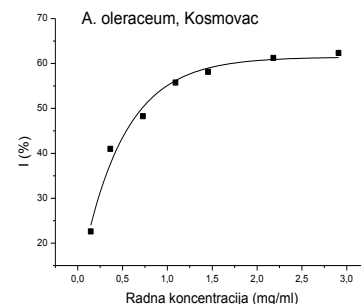
Radna konc. (mg/ml)	Absorbancija				I (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A _{kor}	I-1	I-2	I-3	
<i>A. flavum</i> , Dimitrovgrad								
0,380	0,167	0,166	0,166	0,063	47,61	48,45	48,09	48,05
0,569	0,155	0,157	0,159	0,075	60,05	59,05	58,04	59,05
0,758	0,152	0,151	0,160	0,085	66,38	67,08	62,58	66,73
1,504	0,164	0,171	0,169	0,109	72,25	68,56	69,78	69,17
2,239	0,182	0,194	0,185	0,145	81,51	75,49	79,97	78,99
kontrola	0,244	0,254	0,245	0,048				
IC ₅₀ (mg/ml)					0,402	0,401	0,383	0,395±0,011
<i>A. flavum</i> , Mokra Gora								
0,190	0,163	0,154	0,165	0,062	37,79	43,16	36,24	39,07
0,380	0,152	0,155	0,160	0,064	45,09	43,20	40,25	42,85
0,760	0,156	0,151	0,157	0,074	49,40	52,27	48,88	50,83
1,515	0,166	0,152	0,155	0,115	68,18	76,62	74,76	75,69
2,264	0,170	0,164	0,172	0,117	66,81	70,49	65,88	67,73
kontrola	0,214	0,203	0,211	0,048				
IC ₅₀ (mg/ml)					0,742	0,741	0,775	0,753±0,019
<i>A. flavum</i> , Bela Palanka								
0,380	0,131	0,137	0,139	0,052	42,52	38,84	37,20	39,52
0,760	0,146	0,134	0,134	0,058	36,57	45,45	44,85	42,29
1,515	0,133	0,140	0,140	0,077	60,31	54,94	55,02	57,63
2,264	0,149	0,146	0,141	0,094	60,51	62,66	65,66	64,16
3,008	0,157	0,162	0,158	0,106	63,58	60,18	62,71	62,16
kontrola	0,193	0,182	0,185	0,048				
IC ₅₀ (mg/ml)					0,905	1,065	1,093	1,02±0,101
<i>A. flavum</i> , Babušnica, herba								
0,038	0,195	0,204	0,202	0,045	35,80	32,32	33,16	33,76
0,095	0,184	0,205	0,185	0,046	41,00	32,23	40,62	37,95
0,190	0,186	0,181	0,164	0,049	41,27	43,50	50,85	42,39
0,380	0,169	0,145	0,154	0,062	54,40	64,76	61,00	62,88
0,760	0,137	0,134	0,145	0,071	72,13	73,00	68,47	71,20
kontrola	0,275	0,290	0,283	0,048				
IC ₅₀ (mg/ml)					0,320	0,254	0,185	0,253±0,068



Grafici 8.42.–8.44. Krive zavisnosti inhibicije LP od radne koncentracije ekstrakta za vrstu *A. flavum* sa različitih lokaliteta

Tabela 8.42. Rezultati LP testa za ekstrakte vrsta *A. oleraceum* i *A. melanantherum* sa različitih lokaliteta

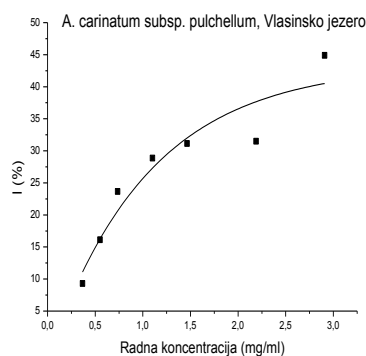
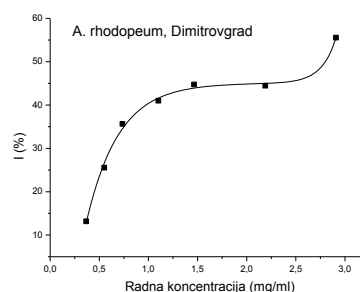
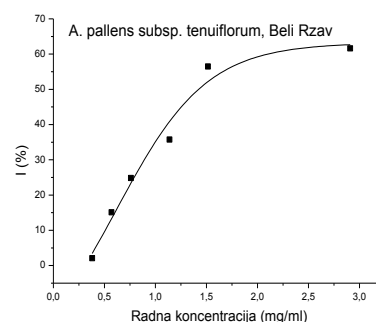
Radna konc, [mg/ml]	Absorbancija				I [%]			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A _{kor}	I-1	I-2	I-3	
<i>A. oleraceum</i> , Kosmovac								
0,1455	0,390	0,361	0,324	0,050	14,57	21,96	31,27	22,60
0,3636	0,310	0,304	0,285	0,065	38,43	39,82	44,69	40,98
0,7273	0,313	0,293	0,282	0,097	45,66	50,85	53,62	48,25
1,0909	0,296	0,293	0,289	0,115	54,54	55,19	56,32	55,75
1,4545	0,279	0,299	0,291	0,123	60,76	55,85	57,90	58,17
2,1818	0,264	0,333	0,335	0,180	78,95	61,46	61,05	61,25
2,9091	0,377	0,536	0,353	0,215	59,28	49,34	65,39	62,33
kontrola	0,436	0,449	0,449	0,046				
IC ₅₀ [mg/ml]					0,804	0,687	0,533	0,675±0,136
<i>A. melanantherum</i> , Plana								
0,380	0,260	0,259	0,264	0,061	4,82	5,29	3,05	4,39
0,569	0,280	0,273	0,270	0,076	2,24	5,37	7,02	4,88
0,760	0,286	0,322	0,294	0,094	8,12	-9,20	4,56	6,34
1,139	0,319	0,289	0,293	0,109	-0,51	13,62	11,89	12,75
1,515	0,299	0,301	0,306	0,141	24,56	23,82	21,08	23,15
2,264	0,150	0,134	0,143	0,074	63,73	71,26	66,98	67,32
3,008	0,147	0,147	0,145	0,095	75,11	74,93	75,89	75,31
kontrola	0,265	0,289	0,257	0,061				
IC ₅₀ [mg/ml]					1,964	1,850	1,942	1,92±0,060
<i>A. melanantherum</i> , Čemernik								
0,380	0,307	0,265	0,271	0,071	-12,82	6,92	4,26	5,59
0,569	0,270	0,256	0,274	0,072	5,20	11,69	3,18	6,69
0,760	0,266	0,256	0,273	0,080	11,17	16,06	7,75	11,66
1,139	0,266	0,283	0,281	0,096	18,93	10,99	11,86	11,42
1,515	0,334	0,291	0,289	0,120	-1,26	18,27	19,01	18,64
2,264	0,148	0,159	0,166	0,074	64,70	59,14	56,15	60,00
3,008	0,155	0,149	0,146	0,086	66,86	69,73	71,29	69,29
kontrola	0,265	0,289	0,257	0,061				
IC ₅₀ [mg/ml]					1,721	2,088	2,134	1,98±0,226



Grafici 8.45.–8.47. Krive zavisnosti inhibicije LP od radne koncentracije ekstrakta za vrsta *A. oleraceum* i *A. melanantherum* sa različitih lokaliteta

Tabela 8.43. Rezultati LP testa za ekstrakte vrste *A. pallens*, *A. rhodopeum* i *A. carinatum* subsp. *pulchellum*

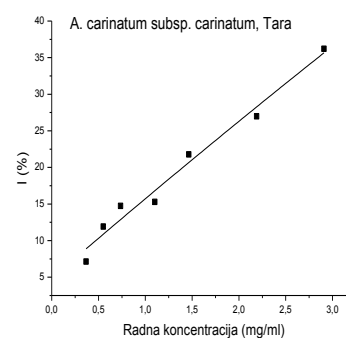
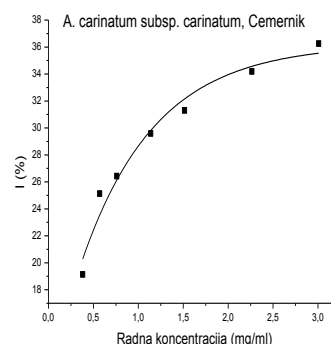
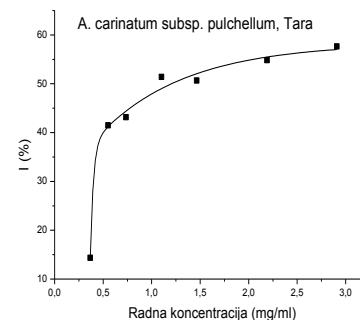
Radna konc, [mg/ml]	Absorbancija				I [%]			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A _{kor}	I-1	I-2	I-3	
<i>A. pallens</i> subsp. <i>tenuiflorum</i> , Beli Rzav								
0,380	0,286	0,248	0,273	0,076	-0,95	17,22	5,15	2,10
0,569	0,255	0,225	0,250	0,076	13,95	28,37	16,20	15,08
0,760	0,263	0,232	0,262	0,106	24,62	39,11	25,03	24,83
1,139	0,267	0,266	0,258	0,129	33,54	33,86	37,97	35,75
1,515	0,267	0,262	0,265	0,176	55,87	58,48	57,04	56,46
2,909	0,229	0,233	0,230	0,149	61,98	59,95	61,26	61,62
kontrola	0,292	0,262	0,262	0,064				
IC ₅₀ [mg/ml]					1,476	1,431	1,374	1,427±0,051
<i>A. rhodopeum</i> , Dimitrovgrad								
0,368	0,288	0,239	0,285	0,072	12,52	32,44	13,81	13,16
0,550	0,248	0,276	0,267	0,080	31,98	20,62	24,04	25,55
0,735	0,271	0,282	0,227	0,101	31,16	26,76	49,01	35,64
1,10	0,266	0,268	0,271	0,123	41,93	40,98	40,03	40,98
1,46	0,306	0,288	0,303	0,163	41,82	49,35	43,01	44,73
2,19	0,338	0,328	0,330	0,195	41,92	46,09	45,41	44,47
2,91	0,365	0,369	0,363	0,256	55,78	54,05	56,78	55,54
kontrola	0,284	0,292	0,274	0,036				
IC ₅₀ [mg/ml]					2,312	2,803	1,997	2,37±0,406
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchellum</i> , Vlasinsko jezero								
0,368	0,229	0,225	0,230	0,059	9,54	11,72	9,07	9,31
0,550	0,194	0,220	0,226	0,065	32,97	17,58	14,65	16,11
0,735	0,215	0,231	0,224	0,080	27,87	19,70	23,41	23,66
1,101	0,238	0,225	0,229	0,098	25,37	32,34	30,19	28,85
1,465	0,250	0,254	0,257	0,126	33,97	31,79	30,47	31,13
2,190	0,282	0,285	0,287	0,156	32,81	31,39	30,26	31,49
2,909	0,318	0,311	0,316	0,211	43,03	46,77	43,85	44,90
kontrola	0,223	0,209	0,250	0,039				
IC ₅₀ [mg/ml]					n.d.	n.d.	n.d.	n.d.



Grafici 8.48.–8.50. Krive zavisnosti inhibicije LP od radne koncentracije ekstrakta za vrste *A. pallens*, *A. rhodopeum* i *A. carinatum* subsp. *pulchellum*

Tabela 8.44. Rezultati LP testa za dve podvrste *A. carinatum*

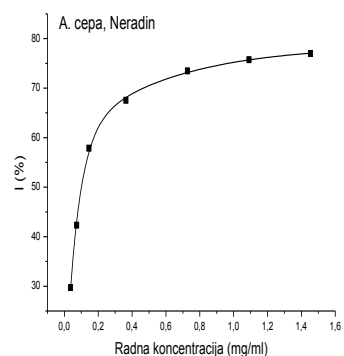
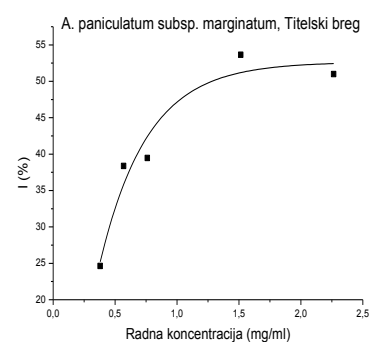
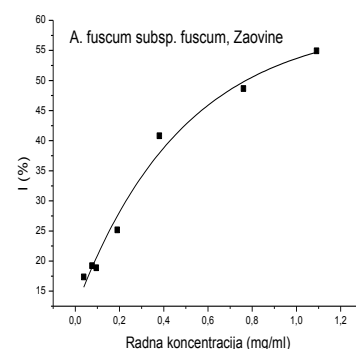
Radna konc, [mg/ml]	Absorbancija				I [%]			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A _{kor}	I-1	I-2	I-3	
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchellum</i> , Tara								
0,368	0,234	0,226	0,228	0,051	12,97	16,78	15,74	14,36
0,550	0,208	0,225	0,219	0,095	45,96	37,81	40,70	41,49
0,735	0,224	0,239	0,218	0,108	44,64	37,37	47,47	43,16
1,101	0,252	0,251	0,242	0,150	51,24	51,58	56,02	51,41
1,465	0,282	0,269	0,271	0,167	44,75	51,15	50,21	50,68
2,190	0,333	0,319	0,327	0,232	51,86	58,14	54,45	54,82
2,909	0,385	0,388	0,399	0,298	58,41	56,86	51,63	57,63
kontrola	0,251	0,245	0,267	0,045				
IC ₅₀ [mg/ml]					1,386	1,213	1,415	1,34±0,109
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i> , Čemernik								
0,380	0,244	0,242	0,241	0,058	18,44	19,27	19,70	19,14
0,569	0,244	0,240	0,238	0,070	23,67	25,43	26,31	25,13
0,760	0,252	0,249	0,224	0,074	21,89	23,14	34,25	26,43
1,139	0,275	0,259	0,260	0,105	24,97	31,98	31,82	29,59
1,515	0,275	0,273	0,288	0,118	30,80	31,81	24,99	31,30
2,264	0,315	0,411	0,312	0,164	33,54	-8,88	34,84	34,19
3,008	0,371	0,366	0,360	0,221	33,84	36,34	38,56	36,25
kontrola	0,215	0,260	0,273	0,039				
IC ₅₀ [mg/ml]					n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i> , Tara								
0,368	0,251	0,236	0,286	0,066	3,23	11,04	-	15,47
0,550	0,249	0,238	0,237	0,070	6,26	11,55	12,28	11,91
0,735	0,245	0,244	0,250	0,084	15,57	15,75	12,92	14,75
1,101	0,257	0,268	0,285	0,101	18,17	12,40	3,31	15,29
1,465	0,266	0,275	0,289	0,133	30,42	25,25	18,31	21,78
2,190	0,309	0,328	0,321	0,180	32,45	22,49	26,01	26,98
2,909	0,355	0,364	0,330	0,228	33,50	28,60	46,53	36,21
kontrola	0,215	0,237	0,262	0,047				
IC ₅₀ [mg/ml]					n.d.	n.d.	n.d.	n.d.



Grafici 8.51.–8.53. Krive zavisnosti inhibicije LP od radne koncentracije ekstrakta podvrste *A. carinatum* subsp. *pulchellum* i *A. carinatum* subsp. *carinatum*

Tabela 8.45. Rezultati LP testa za ekstrakte vrste *A. fuscum* var. *fuscum*, *A. paniculatum* i *A. cepa*

Radna konc. [mg/ml]	Absorbancija				I [%]			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A _{kor}	I-1	I-2	I-3	
<i>A.fuscum</i> var. <i>fuscum</i> , Zaovine								
0,038	0,214	0,236	0,232	0,045	22,59	12,10	14,17	17,34
0,076	0,214	0,219	0,227	0,047	23,45	21,06	17,37	19,22
0,095	0,220	0,221	0,225	0,045	19,83	19,23	17,59	18,88
0,190	0,211	0,212	0,209	0,048	25,47	24,91	26,64	25,19
0,380	0,200	0,219	0,188	0,074	42,38	33,71	47,94	40,83
0,760	0,187	0,171	0,177	0,066	44,81	51,87	49,32	48,66
1,091	0,169	0,171	0,172	0,072	55,77	54,84	54,16	54,92
kontrola	0,266	0,276	0,256	0,048				
IC ₅₀ [mg/ml]					0,637	0,851	0,787	0,759±0,110
<i>A. paniculatum</i> subsp. <i>marginatum</i> , Titelski Breg								
0,380	0,235	0,213	0,217	0,059	18,38	28,62	26,91	24,64
0,569	0,207	0,206	0,196	0,070	36,27	37,12	41,71	38,37
0,760	0,214	0,213	0,202	0,079	37,32	37,85	43,21	39,46
1,515	0,214	0,211	0,210	0,112	52,54	53,94	54,44	53,64
2,264	0,245	0,246	0,247	0,140	51,58	50,94	50,42	50,98
kontrola	0,241	0,280	0,256	0,043				
IC ₅₀ [mg/ml]					1,25759	1,05868	1,32861	1,21±0,140
<i>A. cepa</i> , Neradin								
0,036	0,351	0,326	0,341	0,042	27,01	32,80	29,35	29,72
0,073	0,296	0,293	0,273	0,043	40,22	41,04	45,72	42,33
0,146	0,240	0,264	0,297	0,074	60,80	54,93	47,33	57,87
0,364	0,200	0,192	0,194	0,056	65,93	67,82	67,25	67,54
0,727	0,202	0,198	0,183	0,082	71,74	72,65	76,08	73,49
1,091	0,199	0,198	0,201	0,097	75,76	76,00	75,38	75,72
1,455	0,200	0,203	0,217	0,104	77,31	76,62	73,35	76,96
kontrola	0,471	0,466	0,454	0,041				
IC ₅₀ [mg/ml]					0,104	0,122	0,142	0,123 ± 0,019

**Grafici 8.54.–8.56.** Krive zavisnosti inhibicije LP od radne koncentracije ekstrakata vrste *A. fuscum* var. *fuscum*, *A. paniculatum* i *A. cepa*

8.8 ANTIINFLAMATORNI POTENCIJAL EKSTRAKATA

Tabela 8.46. Inhibicija produkcije 12-HHT, PGE₂, TXB₂ i 12-HETE za ekstrakt *A. flavum*, Babušnica, cela biljka

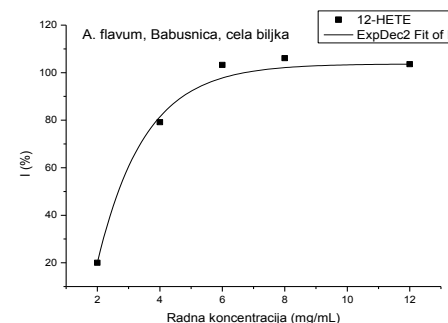
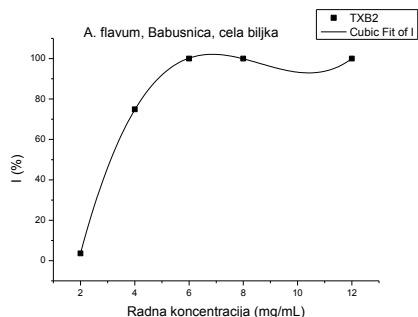
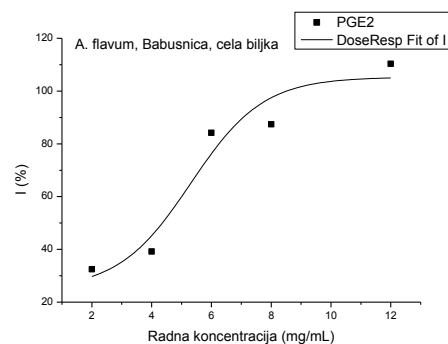
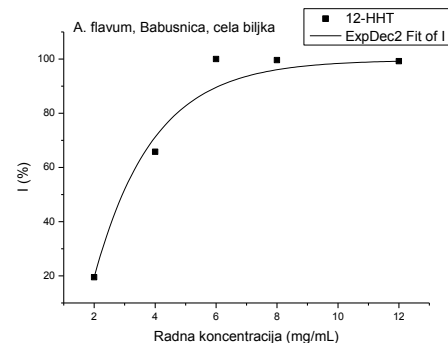
<i>A. flavum</i> , cela biljka		12-HHT/PGB ₂			I [%]
Radna konc, [mg/mL]	Korekcija	Proba- 1	Proba- 2	Proba- 3	srednja vrednost
12	0,000	0,013	0,000	0,000	99,2
8,0	0,000	0,000	0,006	0,000	99,6
6,0	0,000	0,000	0,000	0,000	100
4,0	0,000	0,056	0,283	0,234	65,8
2,0	0,000	0,493	0,476	0,380	19,5
0,4	0,000	0,754	0,927	0,685	0,00
Kontrola	0,039	0,628	0,558	0,606	
IC ₅₀ [mg/mL]*					2,67±0,23

<i>A. flavum</i> , cela biljka		PGE ₂ /PGB ₂			I [%]
Radna konc, [mg/mL]	Korekcija	Proba- 1	Proba- 2	Proba- 3	srednja vrednost
12	0,057	0,047	0,055	0,029	110,3
8,0	0,042	0,090	0,038	0,046	87,4
6,0	0,050	0,074	0,084	0,055	84,2
4,0	0,023	0,083	0,114	0,110	39,2
2,0	0,037	0,126	0,149	0,102	32,4
0,4	0,000	0,188	0,134	0,105	0,00
Kontrola	0,000	0,172	0,086	0,135	
IC ₅₀ [mg/mL]					4,36±0,07

<i>A. flavum</i> , cela biljka		TXB ₂ /PGB ₂			I [%]
Radna konc, [mg/mL]	Korekcija	Proba- 1	Proba- 2	Proba- 3	srednja vrednost
12	0,00	0,00	0,00	0,00	100
8,0	0,00	0,00	0,00	0,00	100
6,0	0,00	0,00	0,00	0,00	100
4,0	0,00	0,037	0,211	0,213	74,0
2,0	0,00	0,628	0,591	0,549	3,60
0,4	0,00	1,236	0,879	0,766	0,00
Kontrola	0,000	0,955	0,318	0,562	
IC ₅₀ [mg/mL]					3,11±0,04

<i>A. flavum</i> , cela biljka		12-HETE/PGB ₂			I [%]
Radna konc, [mg/mL]	Korekcija	Proba- 1	Proba- 2	Proba- 3	srednja vrednost
12	0,296	0,180	0,166	0,214	104
8,0	0,429	0,156	0,271	0,305	106
6,0	0,438	0,302	0,368	0,349	103
4,0	0,502	0,301	1,625	1,512	79,1
2,0	0,133	2,604	2,755	2,311	20,0
0,4	0,210	3,264	3,439	3,643	0,00
Kontrola	0,396	3,118	3,283	3,904	
IC ₅₀ [mg/mL]					2,92±0,27

* Rezultati su izraženi kao IC₅₀ vrednost ± standardna greška ponovljivosti (određena tokom validacije metode)



Grafici 8.57.–8.60. Krive zavisnosti inhibicije produkcije 12-HHT, PGE₂, TXB₂ i 12-HETE od radne koncentracije ekstrakta vrste *A. flavum* (Babušnica, cela biljka)

Tabela 8.47. Inhibicija produkcije 12-HHT, PGE₂, TXB₂ i 12-HETE za ekstrakt nadzemnih delova vrste *A. flavum*, Babušnica

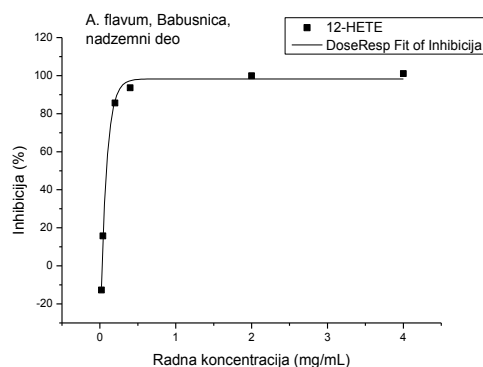
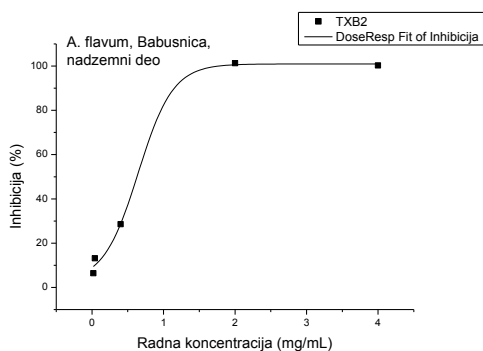
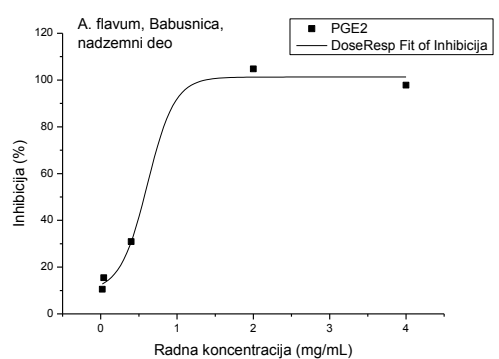
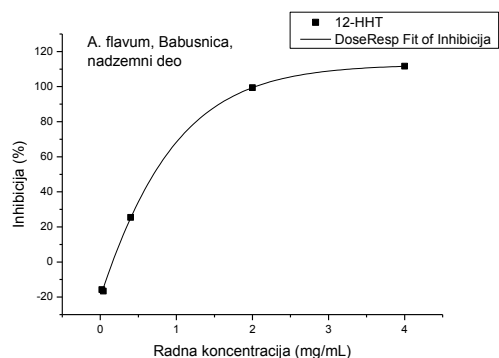
A. flavum, nadzemni deo		12-HHT/PGB ₂			I [%]
Radna konc, [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
4,00	0,10	0,049	0,117	0,046	111,6
2,00	0,067	0,093	0,000	0,115	99,3
0,40	0,080	0,342	0,274	0,266	25,4
0,20	0,067	0,458	0,370	0,355	-14,3
0,04	0,000	0,428	0,381	0,392	-16,6
0,02	0,000	0,419	0,326	0,250	-15,8
Kontrola	0,095	0,272	0,453	0,420	
IC ₅₀ [mg/mL]*	0,700±0,06				

A. flavum, nadzemni deo		PGE ₂ /PGB ₂			I [%]
Radna konc, [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
4,00	0,041	0,052	0,045	0,053	97,8
2,00	0,059	0,043	0,032	0,040	105
0,40	0,027	0,428	0,288	0,298	30,9
0,20	0,000	0,426	0,431	0,395	1,00
0,04	0,000	0,389	0,342	0,338	15,4
0,02	0,000	0,400	0,383	0,349	10,5
Kontrola	0,000	0,450	0,502	0,313	
IC ₅₀ [mg/mL]	0,570±0,01				

A. flavum, nadzemni deo		TXB ₂ /PGB ₂			I [%]
Radna konc, [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
4,00	0,050	0,059	0,030	0,052	100,2
2,00	0,062	0,050	0,034	0,049	100,3
0,40	0,053	1,046	0,618	0,748	28,6
0,20	0,055	1,336	1,652	1,647	-12,0
0,04	0,062	1,332	1,124	1,205	13,2
0,02	0,085	1,470	1,339	1,182	6,40
Kontrola	0,081	1,401	1,746	1,087	
IC ₅₀ [mg/mL]	0,629±0,008				

A. flavum, nadzemni deo		12-HETE/PGB ₂			I [%]
Radna konc, [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
4,00	0,104	0,049	0,117	0,046	101
2,00	0,067	0,093	0,000	0,115	99,9
0,40	0,080	0,342	0,428	0,026	93,6
0,20	0,206	0,518	0,583	0,336	85,6
0,04	0,602	3,800	3,100	3,270	15,7
0,02	0,141	3,760	3,900	3,600	-9,9
Kontrola	0,572	2,339	4,977	4,356	
IC ₅₀ [mg/mL]	0,084±0,008				

*Rezultati su izraženi kao IC₅₀ vrednost ± standardna greška ponovljivosti (određena tokom validacije metode)



Grafici 8.61.–8.64. Krive zavisnosti inhibicije produkcije 12-HHT, PGE₂, TXB₂ i 12-HETE od radne koncentracije ekstrakta vrste *A. flavum* (Babušnica, nadzemni delovi)

Tabela 8.48. Inhibicija produkcije 12-HHT, PGE₂, TXB₂ i 12-HETE za ekstrakt A, *melanantherum*, Plana

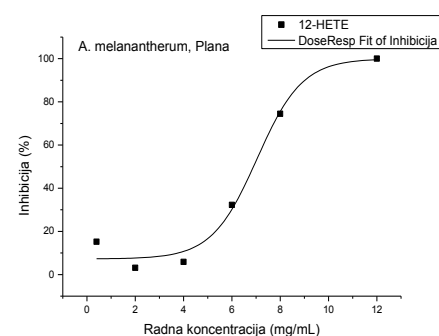
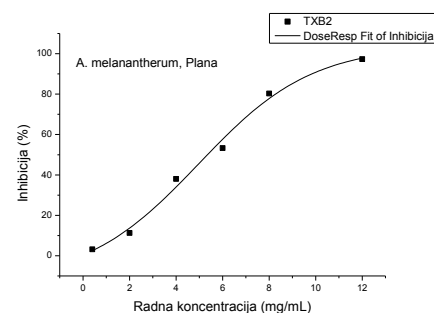
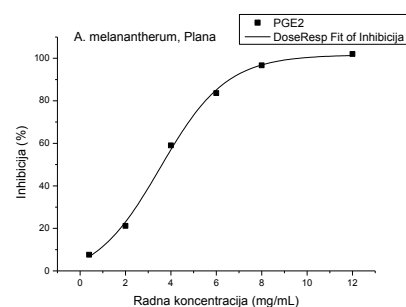
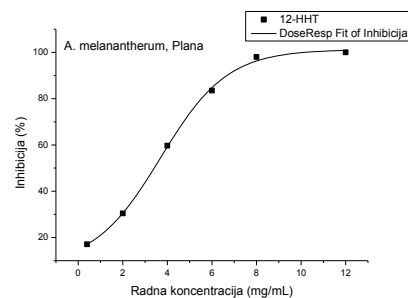
A. <i>melanantherum</i> , Plana		12-HHT/PGB ₂			I [%]
Radna konc. [mg/mL]	Korekcija	Proba- 1	Proba- 2	Proba- 3	srednja vrednost
12	0,000	0,000	0,000	0,000	100
8,0	0,000	0,000	0,000	0,032	98,0
6,0	0,000	0,106	0,038	0,126	83,5
4,0	0,000	0,221	0,210	0,227	59,7
2,0	0,000	0,347	0,451	0,337	30,4
0,4	0,000	0,333	0,477	0,542	17,1
Kontrola	0,000	0,505	0,600	0,526	
IC ₅₀ [mg/mL] ^a					3,41±0,29

A. <i>melanantherum</i> , Plana		PGE ₂ /PGB ₂			I [%]
Radna konc. [mg/mL]	Korekcija	Proba- 1	Proba- 2	Proba- 3	srednja vrednost
12	0,000	0,000	0,000	0,000	100
8,0	0,014	0,040	0,060	0,095	74,5
6,0	0,000	0,106	0,167	0,130	32,3
4,0	0,000	0,182	0,185	0,193	5,90
2,0	0,000	0,167	0,190	0,219	3,10
0,4	0,000	0,108	0,192	0,206	15,2
Kontrola	0,000	0,219	0,162	0,215	
IC ₅₀ [mg/mL]					3,61±0,06

A. <i>melanantherum</i> , Plana		TXB ₂ /PGB ₂			I [%]
Radna konc. [mg/mL]	Korekcija	Proba- 1	Proba- 2	Proba- 3	srednja vrednost
12	0,048	0,000	0,034	0,024	102
8,0	0,036	0,050	0,075	0,123	96,7
6,0	0,057	0,261	0,297	0,310	83,6
4,0	0,055	0,632	0,699	0,568	59,0
2,0	0,078	1,433	1,027	1,107	21,2
0,4	0,054	0,775	1,593	1,701	7,60
Kontrola	0,084	1,578	1,204	1,702	
IC ₅₀ [mg/mL]					5,35±0,07

A. <i>melanantherum</i> , Plana		12-HETE/PGB ₂			I [%]
Radna konc. [mg/mL]	Korekcija	Proba- 1	Proba- 2	Proba- 3	srednja vrednost
12	0,779	0,805	0,839	0,967	97,3
8,0	0,853	1,276	1,552	1,695	80,3
6,0	0,734	2,043	2,494	2,331	53,3
4,0	0,585	2,463	2,619	2,864	38,0
2,0	0,697	2,774	4,235	3,949	11,3
0,4	0,550	2,539	4,444	4,336	3,20
Kontrola	0,670	2,543	2,625	1,705	
IC ₅₀ [mg/mL]					6,89±0,64

^aRezultati su izraženi kao IC₅₀ vrednost ± standardna greška ponovljivosti (određena tokom validacije metode)

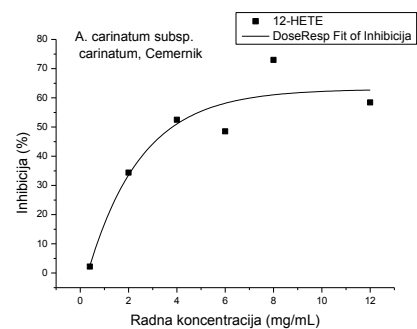
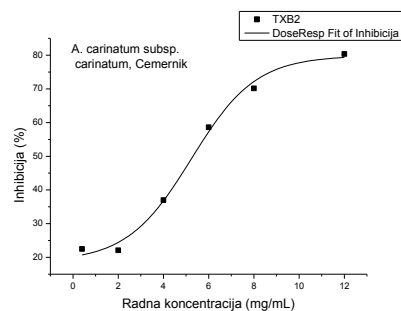
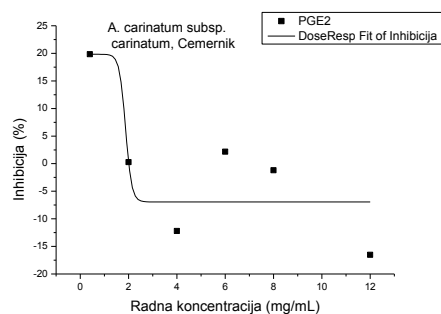
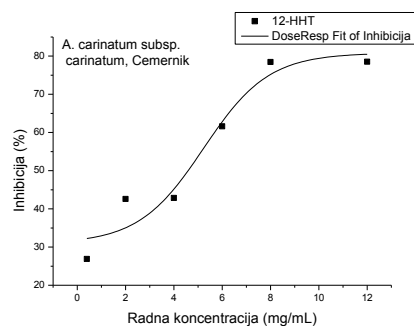


Grafici 8.65.–8.68. Krive zavisnosti inhibicije produkcije 12-HHT, PGE₂, TXB₂ i 12-HETE od radne koncentracije ekstrakta vrste *A. melanatherum* (Plana)

Tabela 8.49. Inhibicija produkcije 12-HHT, PGE₂, TXB₂ i 12-HETE za ekstrakt *A. carinatum* subsp. *carinatum*, Čemernik

<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i>		12-HHT/PGB ₂			I [%]
Radna konc. [g/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
12	0,000	0,065	0,090	0,102	78,5
8	0,00	0,107	0,071	0,08	78,4
6,0	0,000	0,116	0,152	0,193	61,6
4,0	0,000	0,199	0,234	0,252	42,9
2,0	0,000	0,239	0,223	0,226	42,6
0,4	0,000	0,268	0,303	0,306	26,9
Kontrola	0,000	0,301	0,469	0,430	
IC ₅₀ [mg/mL] [*]					4,58±0,39
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i>		PGE ₂ /PGB ₂			I [%]
Radna konc. [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
12	0,000	0,470	0,506	0,573	-14,4
8,0	0,000	0,427	0,406	0,432	0,68
6,0	0,000	0,432	0,440	0,431	3,98
4,0	0,000	0,511	0,468	0,424	-10,1
2,0	0,000	0,507	0,387	0,353	2,14
0,4	0,000	0,336	0,325	0,341	21,3
Kontrola	0,000	0,558	0,401	0,291	
IC ₅₀ [mg/mL]					/
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i>		TXB ₂ /PGB ₂			I [%]
Radna konc. [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
12	0,000	0,407	0,466	0,503	79,3
8,0	0,000	0,652	0,657	0,660	68,6
6,0	0,000	0,905	0,931	0,906	56,4
4,0	0,000	1,285	1,455	1,370	33,7
2,0	0,000	2,029	1,518	1,370	18,0
0,4	0,000	1,602	1,856	1,624	18,4
Kontrola	0,000	2,567	2,331	1,487	
IC ₅₀ [mg/mL]					5,30±0,07
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i>		12-HETE/PGB ₂			I [%]
Radna konc. [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
12	0,000	1,000	1,063	1,955	58,4
8,0	0,000	1,269	0,704	0,704	73,0
6,0	0,000	1,817	1,739	1,574	48,5
4,0	0,000	1,077	1,918	1,878	52,5
2,0	0,000	1,635	2,366	2,245	34,4
0,4	0,000	2,598	2,721	2,455	2,24
Kontrola	0,000	1,831	3,654	3,140	
IC ₅₀ [mg/mL]					3,81±0,35

* Rezultati su izraženi kao IC₅₀ vrednost ± standardna greška ponovljivosti (određena tokom validacije metode)



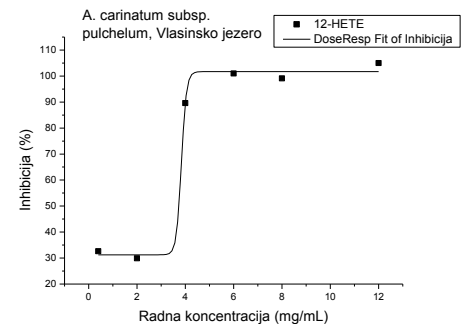
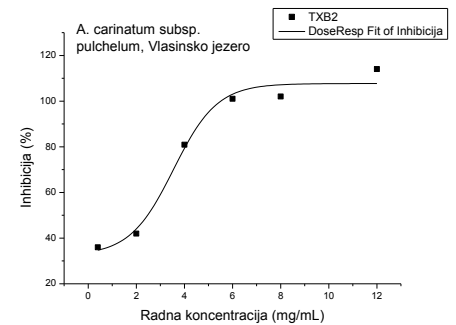
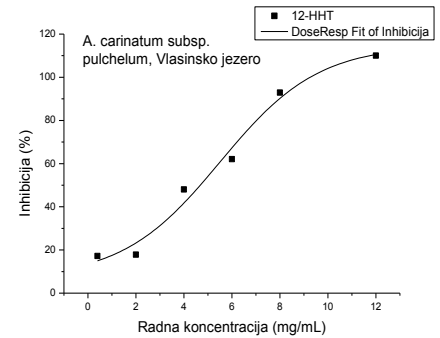
Grafici 8.69.–8.72. Krive zavisnosti inhibicije produkcije 12-HHT, PGE₂, TXB₂ i 12-HETE od radne koncentracije ekstrakta vrste *A. carinatum* subsp. *carinatum* (Čemernik)

Tabela 8.50. Inhibicija produkcije 12-HHT, TXB₂ i 12-HETE za ekstrakt *A. carinatum* subsp. *pulchelum*, Vlasinsko jezero

<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchelum</i>					
		12-HHT/PGB ₂			I [%]
Radna konc. [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
12	1,850	1,974	1,835	1,594	110
8,0	1,871	1,879	1,928	1,915	92,9
6,0	1,950	1,720	2,336	2,379	62,1
4,0	1,490	1,565	1,947	1,759	48,0
2,0	2,550	2,679	3,155	3,083	17,8
0,4	2,490	3,084	2,826	2,836	17,2
Kontrola	2,215	2,637	3,011	2,540	
IC ₅₀ [mg/mL]*					4,68±0,40
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchelum</i>					
		TXB ₂ /PGB ₂			I [%]
Radna konc. [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
12	0,068	0,016	0,029	0,011	114
8,0	0,026	0,000	0,032	0,028	102
6,0	0,054	0,053	0,055	0,045	101
4,0	0,056	0,118	0,143	0,101	80,9
2,0	0,058	0,242	0,292	0,236	42,0
0,4	0,146	0,358	0,347	0,388	36,0
Kontrola	0,012	0,259	0,375	0,428	
IC ₅₀ [mg/mL]					2,47±0,03
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchelum</i>					
		12-HETE/PGB ₂			I [%]
Radna konc. [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
12	0,278	0,261	0,232	0,224	105
8,0	0,254	0,250	0,263	0,270	99,1
6,0	0,318	0,239	0,249	0,449	101
4,0	0,364	0,364	0,509	0,466	89,6
2,0	0,183	0,474	0,894	0,834	29,9
0,4	0,272	0,937	0,772	0,697	32,6
Kontrola	0,256	0,960	1,045	1,123	
IC ₅₀ [mg/mL]					3,73±0,35
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchelum</i>					
		PGE ₂ /PGB ₂ **			I [%]
Radna konc. [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
12	0,000	0,000	0,000	0,000	/
8,0	0,000	0,000	0,000	0,000	/
6,0	0,000	0,000	0,000	0,000	/
4,0	0,000	0,000	0,000	0,000	/
2,0	0,000	0,000	0,000	0,000	/
0,4	0,000	0,000	0,000	0,000	/
Kontrola	0,000	0,000	0,045	0,053	
IC ₅₀ [mg/mL]					/

* Rezultati su izraženi kao IC₅₀ vrednost ± standardna greška ponovljivosti (određena tokom validacije metode)

** Količina PGE₂ u sistemu je bila suviše mala da bi se mogao pratiti uticaj ekstrakta na ovaj metabolit



Grafici 8.73.–8.75. Krive zavisnosti inhibicije produkcije 12-HHT, TXB₂ i 12-HETE od radne koncentracije ekstrakta vrste *A. carinatum* subsp. *pulchelum* (Vlasinsko jezero)

Tabela 8.51. Inhibicija produkcije 12-HHT, PGE₂, TXB₂ i 12-HETE za ekstrakt *A. fuscum* var. *fuscum*, Zaovine

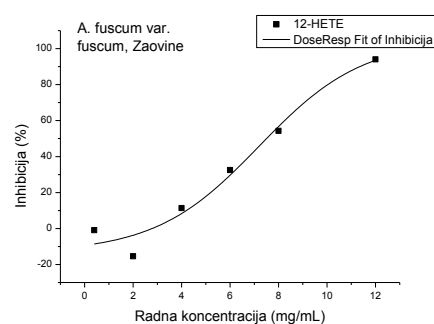
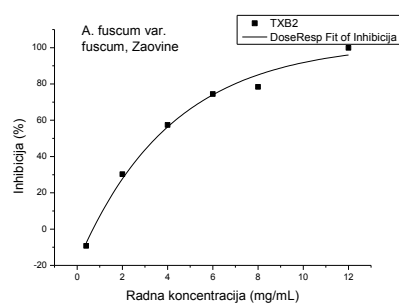
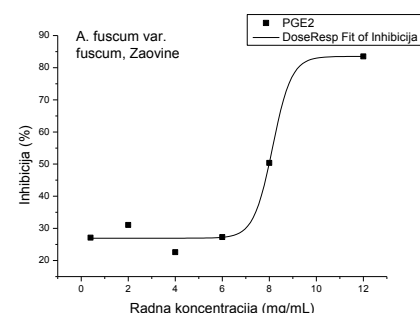
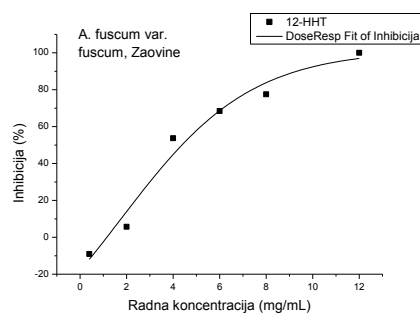
<i>A. fuscum</i> var. <i>fuscum</i>		12-HHT/PGB ₂			I [%]
Radna konc, [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
12	0,000	0,000	0,000	0,000	100
8,0	0,000	0,125	0,104	0,139	77,5
6,0	0,000	0,139	0,213	0,163	68,5
4,0	0,000	0,262	0,249	0,245	53,7
2,0	0,000	0,474	0,443	0,621	5,74
0,4	0,000	0,687	0,538	0,554	-9,08
Kontrola	0,000	0,505	0,600	0,526	
IC ₅₀ [mg/mL]*					4,37±0,37

<i>A. fuscum</i> var. <i>fuscum</i>		PGE ₂ /PGB ₂			I [%]
Radna konc, [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
12	0,017	0,113	0,035	0,000	93,1
8,0	0,045	0,144	0,142	0,144	86,3
6,0	0,000	0,142	0,144	0,147	66,3
4,0	0,000	0,202	0,127	0,132	81,6
2,0	0,000	0,220	0,070	0,121	50,0
0,4	0,000	0,172	0,154	0,108	24,0
Kontrola	0,000	0,219	0,162	0,215	
IC ₅₀ [mg/mL]					7,99±0,13

<i>A. fuscum</i> var. <i>fuscum</i>		TXB ₂ /PGB ₂			I [%]
Radna konc, [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
12	0,079	0,125	0,067	0,047	99,9
8,0	0,037	0,345	0,361	0,317	78,4
6,0	0,051	0,500	0,379	0,355	74,4
4,0	0,039	0,798	0,498	0,623	57,4
2,0	0,076	1,439	0,771	0,968	30,3
0,4	0,055	1,595	1,580	1,611	-9,22
Kontrola	0,084	1,578	1,204	1,702	
IC ₅₀ [mg/mL]					3,47±0,05

<i>A. fuscum</i> var. <i>fuscum</i>		12-HETE/PGB ₂			I [%]
Radna konc, [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
12	0,472	1,075	0,463	0,474	83,5
8,0	0,514	2,051	2,095	1,967	50,4
6,0	0,538	2,536	2,964	2,859	27,3
4,0	0,610	2,906	3,738	4,039	22,6
2,0	1,019	4,613	4,731	5,242	31,1
0,4	0,800	4,472	4,000	4,013	27,1
Kontrola	0,670	3,719	4,213	4,070	
IC ₅₀ [mg/mL]					7,51±0,70

*Rezultati su izraženi kao IC₅₀ vrednost ± standardna greška ponovljivosti (određena tokom validacije metode)



Grafici 8.76.–8.79. Krive zavisnosti inhibicije produkcije 12-HHT, PGE₂, TXB₂ i 12-HETE od radne koncentracije ekstrakta vrste *A. fuscum* var. *fuscum* (Zaovine)

Tabela 8.52. Inhibicija produkcije 12-HHT, TXB₂ i 12-HETE za ekstrakt *A. pallens*, Beli Rzav

<i>A. pallens</i>		12-HHT/PGB ₂ *			I [%]
Radna konc. [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
12	2,221	2,543	2,625	1,705	/
8,0	2,221	/	2,518	2,282	/
6,0	2,502	2,723	2,659	2,409	/
4,0	2,524	2,578	/	/	/
2,0	2,502	2,691	2,418	2,443	/
0,4	2,476	2,224	2,478	2,665	/
Kontrola	2,589	2,910	2,261	2,656	/
IC ₅₀ [mg/mL]					/

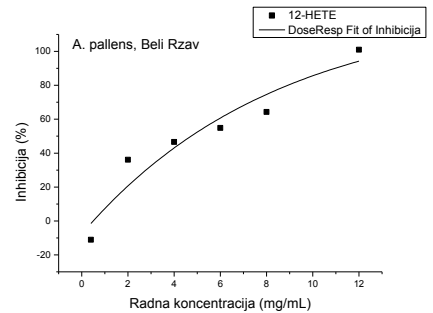
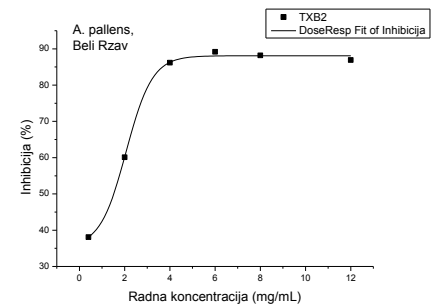
<i>A. pallens</i>		TXB ₂ /PGB ₂			I [%]
Radna konc. [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
12	0,00	/	0,051	0,052	86,9
8,0	0,041	0,063	0,102	0,097	88,2
6,0	0,037	0,059	0,090	0,090	89,2
4,0	0,053	0,109	0,088	0,127	86,2
2,0	0,028	0,149	0,167	0,244	60,1
0,4	0,057	0,287	0,333	0,287	38,1
Kontrola	0,00	0,432	0,414	0,344	/
IC ₅₀ [mg/mL]**					4,73±0,06

<i>A. pallens</i>		12-HETE/PGB ₂			I [%]
Radna konc. [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
12	0,264	/	0,234	0,285	101
8,0	0,391	0,660	0,600	0,576	64,3
6,0	0,310	0,603	0,655	0,509	54,9
4,0	0,380	0,641	0,749	0,742	46,6
2,0	0,313	0,741	0,645	0,738	36,1
0,4	0,240	1,102	0,812	0,867	-11,1
Kontrola	0,376	1,029	1,211	0,742	/
IC ₅₀ [mg/mL]					3,75±0,35

<i>A. pallens</i>		PGE ₂ /PGB ₂ *			I [%]
Radna konc. [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
12	0,000	0,000	0,000	0,000	/
8,0	0,000	0,000	0,000	0,000	/
6,0	0,000	0,000	0,000	0,000	/
4,0	0,000	0,000	0,000	0,000	/
2,0	0,000	0,000	0,000	0,000	/
0,4	0,000	0,000	0,000	0,000	/
Kontrola	0,000	0,040	0,000	0,050	/
IC ₅₀ [mg/mL]					/

* Količina produkovanog HHT i PGE₂ u sistemu je bila suviše mala da bi se mogao pratiti uticaj ekstrakta na ove metabolite

** Rezultati su izraženi kao IC₅₀ vrednost ± standardna greška ponovljivosti (određena tokom validacije metode)



Grafici 8.80.–8.81. Krive zavisnosti inhibicije produkcije TXB₂ i 12-HETE od radne koncentracije ekstrakta vrste *A. pallens* (Beli Rzav)

Tabela 8.53. Inhibicija produkcije 12-HHT, TXB₂ i 12-HETE za ekstrakt *A. oleraceum*, Kosmovac

<i>A. oleraceum</i>		12-HHT/PGB ₂ *			I [%]
Radna konc. [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
12	2,470	2,491	3,281	1,756	/
8,0	2,193	2,154	2,458	2,455	/
6,0	2,363	3,892	2,267	2,455	/
4,0	3,235	2,733	2,345	2,644	/
2,0	2,114	2,451	1,537	1,448	/
0,4	2,242	2,941	2,053	2,226	/
Kontrola	2,877	2,367	2,772	2,738	/

IC₅₀ [mg/mL]** /

<i>A. oleraceum</i>		TXB ₂ /PGB ₂			I [%]
Radna konc. [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
12	0,000	0,000	0,000	0,000	100
8,0	0,020	0,026	0,024	0,029	97,4
6,0	0,035	0,056	0,062	0,053	91,7
4,0	0,000	0,084	0,083	0,103	65,8
2,0	0,015	0,118	0,120	0,148	56,9
0,4	0,068	0,240	0,306	0,251	25,2
Kontrola	0,000	0,279	0,257	0,253	/

IC₅₀ [mg/mL] 1,85±0,03

<i>A. oleraceum</i>		12-HETE/PGB ₂			I [%]
Radna konc. [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
12	0,229	0,111	0,199	0,118	110
8,0	0,257	0,422	0,231	0,192	97,3
6,0	0,118	0,308	0,388	0,409	72,2
4,0	0,134	0,544	0,353	0,333	69,3
2,0	0,216	0,896	0,803	0,926	26,8
0,4	0,388	1,097	1,150	0,984	23,5
Kontrola	0,224	1,050	1,443	0,880	/

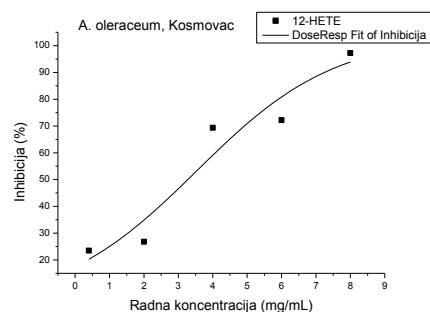
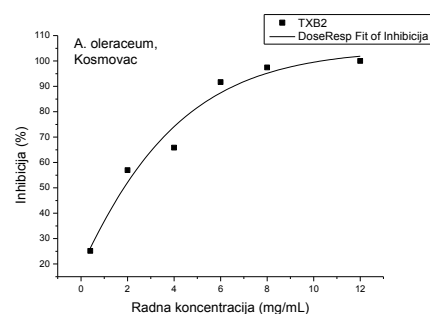
IC₅₀ [mg/mL] 3,27±0,30

<i>A. oleraceum</i>		PGE ₂ /PGB ₂ *			I [%]
Radna konc. [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
12	0,000	0,000	0,000	0,000	/
8,0	0,000	0,000	0,000	0,000	/
6,0	0,000	0,000	0,000	0,000	/
4,0	0,000	0,000	0,000	0,000	/
2,0	0,000	0,000	0,000	0,000	/
0,4	0,000	0,000	0,000	0,000	/
Kontrola	0,000	0,065	0,000	0,055	/

IC₅₀ [mg/mL] /

* Količina produkovanih PGE₂ i 12HHT u sistemu je bila suviše mala da bi se mogao pratiti uticaj ekstrakta na ove metabolite

** Rezultati su izraženi kao IC₅₀ vrednost ± standardna greška ponovljivosti (određena tokom validacije metode)



Grafici 8.82.–8.83. Krive zavisnosti inhibicije produkcije TXB₂ i 12-HETE od radne koncentracije ekstrakta vrste *A. oleraceum* (Kosmovac)

Tabela 8.54. Inhibicija produkcije 12-HHT, PGE₂, TXB₂ i 12-HETE za ekstrakt *A. paniculatum*, Titelski breg

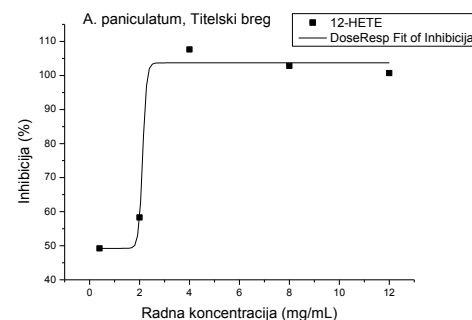
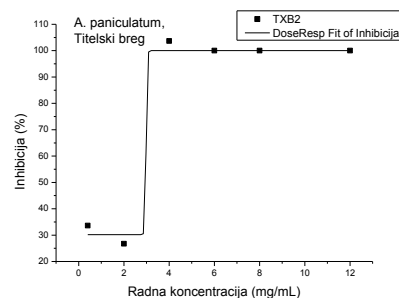
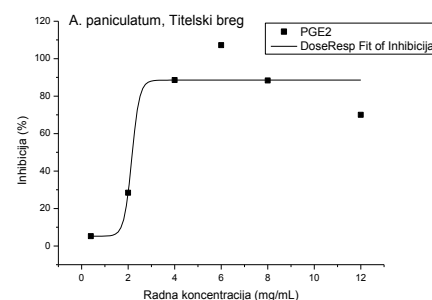
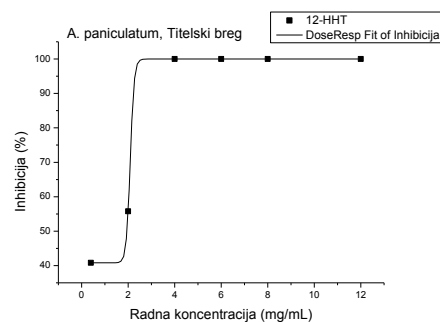
<i>A. paniculatum</i>		12-HHT/PGB ₂				I [%]
Radna konc. [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost	
12	0,000	0,000	0,000	0,000	100	
8,0	0,000	0,000	0,000	0,000	100	
6,0	0,000	0,000	/	/	100	
4,0	0,000	0,000	0,000	0,000	100	
2,0	0,000	0,200	0,247	0,294	55,8	
0,4	0,005	0,356	0,397	0,255	40,8	
Kontrola	0,039	0,628	0,558	0,606		
IC ₅₀ [mg/mL]*						1,95±0,166

<i>A. paniculatum</i>		PGE ₂ /PGB ₂				I [%]
Radna konc. [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost	
12	0,086	0,115	0,161	0,119	70,0	
8,0	0,074	0,090	0,093	0,092	88,4	
6,0	0,057	0,046	/	/	107	
4,0	0,054	0,070	0,067	0,077	88,6	
2,0	0,067	0,163	0,178	0,187	28,5	
0,4	0,034	0,224	0,175	0,136	5,2	
Kontrola	0,000	0,172	0,150	0,135		
IC ₅₀ [mg/mL]						2,18±0,03

<i>A. paniculatum</i>		TXB ₂ /PGB ₂				I [%]
Radna konc. [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost	
12	0,000	0,000	0,000	0,000	100	
8,0	0,000	0,000	0,000	0,000	100	
6,0	0,000	0,000	/	/	100	
4,0	0,050	0,036	0,021	0,025	104	
2,0	0,060	0,750	0,362	0,412	26,7	
0,4	0,040	0,773	0,319	0,246	33,6	
Kontrola	0,000	0,955	0,318	0,562		
IC ₅₀ [mg/mL]						2,96±0,03

<i>A. paniculatum</i>		12-HETE/PGB ₂				I [%]
Radna konc. [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost	
12	0,124	0,129	0,092	0,090	100,7	
8,0	0,213	0,156	0,102	0,128	102,8	
6,0	0,223	0,119	/	/	103,4	
4,0	0,405	0,164	0,175	0,178	107,6	
2,0	0,423	2,707	1,205	1,159	58,3	
0,4	0,179	1,730	1,720	1,715	49,2	
Kontrola	0,396	3,118	3,283	3,904		
IC ₅₀ [mg/mL]						1,80±0,20

* Rezultati su izraženi kao IC₅₀ vrednost ± standardna greška ponovljivosti (određena tokom validacije metode)



Grafici 8.84.–8.87. Krive zavisnosti inhibicije produkcije 12-HHT, PGE₂, TXB₂ i 12-HETE od radne koncentracije ekstrakta vrste *A. paniculatum* (Titelski breg)

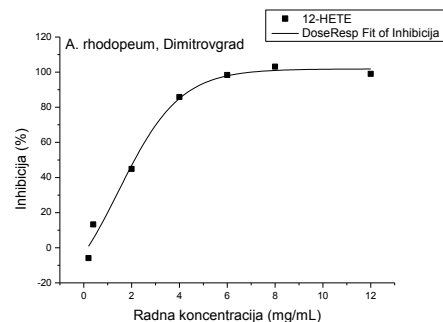
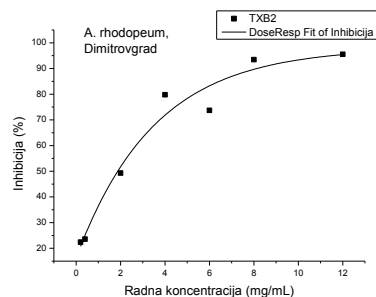
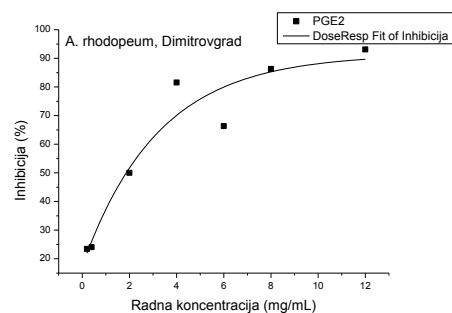
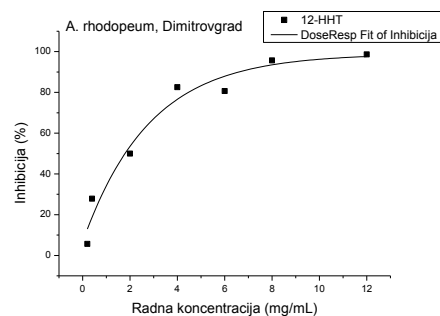
Tabela 8.55. Inhibicija produkcije 12-HHT, PGE₂, TXB₂ i 12-HETE za ekstrakt *A. rhodopeum*, Dimitrovgrad

<i>A. rhodopeum</i>		12-HHT/PGB ₂			[%]
Radna konc, [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
12	0,000	0,000	0,019	0,023	98,6
8,0	0,000	0,128	0,000	0,000	95,7
6,0	0,000	0,032	0,277	0,258	80,7
4,0	0,000	0,135	0,184	0,195	82,5
2,0	0,027	0,653	0,414	0,484	50,0
0,4	0,065	0,641	0,842	0,830	27,9
0,2	0,014	1,036	0,920	0,858	5,66
Kontrola	0,000	1,005	1,031	0,902	
IC ₅₀ [mg/mL]*					1,79±0,15

<i>A. rhodopeum</i>		PGE ₂ /PGB ₂			I [%]
Radna konc, [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
12	0,019	0,040	0,027	0,045	93,1
8,0	0,028	0,086	0,050	0,058	86,3
6,0	0,035	0,072	0,150	0,150	66,3
4,0	0,028	0,086	0,079	0,066	81,6
2,0	0,000	0,160	0,103	0,135	50,0
0,4	0,000	0,189	0,194	0,222	24,0
0,2	0,000	0,283	0,205	0,121	23,4
Kontrola	0,000	0,284	0,299	0,213	
IC ₅₀ [mg/mL]					1,86±0,03

<i>A. rhodopeum</i>		TXB ₂ /PGB ₂			I [%]
Radna konc, [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
12	0,000	0,054	0,071	0,069	95,5
8,0	0,000	0,248	0,000	0,037	93,5
6,0	0,000	0,150	0,498	0,495	73,7
4,0	0,035	0,381	0,305	0,299	79,8
2,0	0,033	0,914	0,738	0,655	49,3
0,4	0,000	1,078	1,081	1,165	23,5
0,2	0,029	2,018	0,752	0,691	22,4
Kontrola	0,041	1,539	1,687	1,246	
IC ₅₀ [mg/mL]					1,87±0,03

<i>A. rhodopeum</i>		12-HETE/PGB ₂			I [%]
Radna konc, [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
12	0,457	0,510	0,483	0,512	99,0
8,0	0,531	0,361	0,421	0,376	103,1
6,0	0,737	0,501	0,955	0,977	98,4
4,0	1,088	1,546	1,883	1,808	85,8
2,0	0,690	3,372	3,227	3,139	44,9
0,4	0,385	4,294	4,404	4,531	13,2
0,2	0,364	5,949	5,281	4,602	-5,9
Kontrola	0,464	5,544	5,455	4,309	
IC ₅₀ [mg/mL]					2,12±0,20



*Rezultati su izraženi kao IC₅₀ vrednost ± standardna greška ponovljivosti (određena tokom validacije metode)

Grafici 8.88.–8.91. Krive zavisnosti inhibicije produkcije 12-HHT, PGE₂, TXB₂ i 12-HETE od radne koncentracije ekstrakta vrste *A. rhodopeum* (Dimitrovgrad)

Tabela 8.56. Inhibicija produkcije TXB₂ i 12-HETE za ekstrakte *A. cepa*, Neradin i *A. sativum*, Šajkaš (količina produkovanog HHT i PGE₂ u sistemu je bila suviše mala da bi se mogao pratiti uticaj ekstrakta na ove metabolite)

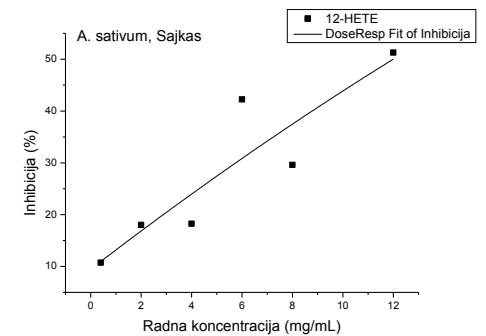
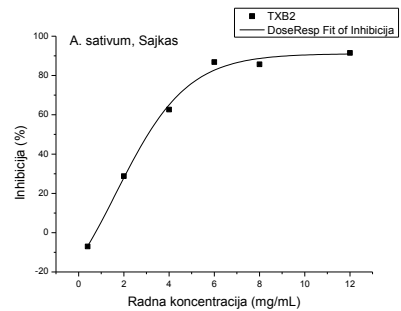
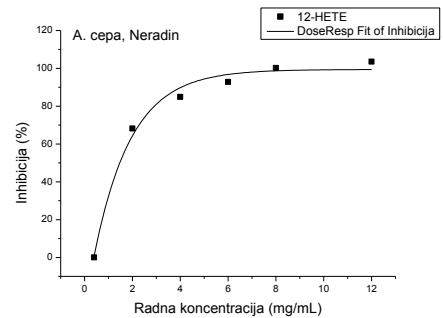
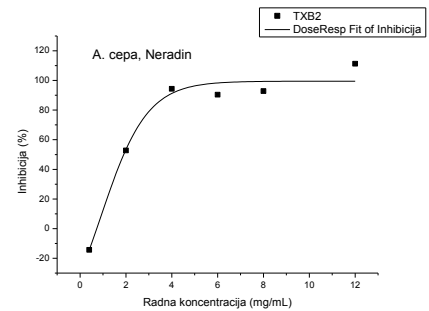
<i>A. cepa</i>		TXB ₂ /PGB ₂			I [%]
Radna konc. [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
12	0,039	0,020	0,000	0,012	111
8,0	0,026	0,044	/	/	92,8
6,0	0,024	0,023	0,055	0,067	90,4
4,0	0,061	0,058	0,094	0,075	94,3
2,0	0,124	/	0,278	0,207	52,8
0,4	0,124	0,427	0,420	0,385	-14,3
Kontrola	0,071	0,370	0,308	0,289	
IC ₅₀ [mg/mL]**					1,91±0,03

<i>A. cepa</i>		12-HETE/PGB ₂			I [%]
Radna konc. [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
12	0,061	0,034	0,000	0,070	103
8,0	0,067	0,065	/	/	100
6,0	0,055	0,110	0,086	0,129	92,9
4,0	0,086	0,174	0,209	0,213	84,9
2,0	0,000	/	0,254	0,221	68,2
0,4	0,205	0,979	1,080	0,797	0,00
Kontrola	0,185	0,979	0,958	0,859	
IC ₅₀ [mg/mL]					1,47±0,14

<i>A. sativum</i>		TXB ₂ /PGB ₂			I [%]
Radna konc. [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
12	0,00	0,047	0,045	0,057	91,48
8,0	0,00	0,102	0,114	0,110	85,69
6,0	0,00	0,086	0,087	0,109	86,81
4,0	0,00	0,142	0,153	0,184	62,67
2,0	0,00	0,317	0,235	0,231	28,75
0,4	0,00	0,363	0,429	0,418	-7,05
Kontrola	0,00	0,259	0,375	0,428	
IC ₅₀ [mg/mL]					3,07±0,04

<i>A. sativum</i>		12-HETE/PGB ₂			I [%]
Radna konc. [mg/mL]	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	srednja vrednost
12	0,00	0,708	0,822	0,750	51,3
8,0	0,00	0,838	0,679	0,830	29,6
6,0	0,00	0,769	0,818	0,747	42,2
4,0	0,00	0,942	0,908	0,864	18,3
2,0	0,00	0,798	1,037	0,917	18,0
0,4	0,00	0,946	1,056	1,277	10,7
Kontrola	0,00	0,960	1,045	1,123	
IC ₅₀ [mg/mL]					11,99±1,12

** Rezultati su izraženi kao IC₅₀ vrednost ± standardna greška ponovljivosti (određena tokom validacije metode)



Grafici 8.92.–8.95. Krive zavisnosti inhibicije produkcije TXB₂ i 12-HETE od radne koncentracije ekstrakata vrsta *A. cepa* (Neradin) i *A. sativum* (Šajkaš)

8.9. ANTIMUTAGENA AKTIVNOST EKSTRAKATA

Tabela 8.57. Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata na spontanu mutagenezu (bez dodatka *t*-BOOH) u *E. coli* IC202

ekstrakt	<i>A. flavum</i>		<i>A. melanantherum</i>		<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i>		
	Koncentracija (mg/petri šolji)	broj Trp ⁺	Srednja vrednost	broj Trp ⁺	Srednja vrednost	broj Trp ⁺	Srednja vrednost
0		29		29		29	
		44	36±8	44	36±8	44	36±8
		35		35		35	
MeOH		47		47		47	
		38	41±5	38	41±5	38	41±5
		38		38		38	
0,1		27	26±2	33	34±1	40	48±12
		24		35		57	
0,5		51	47±6	55	59±5	73	58±21
		43		62		44	
1,0		34	40±8	40	40±0	61	58±4
		46		40		55	
4,0		30		40		46	
		56	42±13	26	40±15	50	57±16
		39		55		75	

Tabela 8.58. Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakata na indukovanu mutagenezu (sa dodatkom *t*-BOOH) u *E. coli* IC202

ekstrakt	<i>A. flavum</i>		<i>A. melanantherum</i>		<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i>		
	Koncentracija (mg/petri šolji)	broj Trp ⁺	Srednja vrednost	broj Trp ⁺	Srednja vrednost	broj Trp ⁺	Srednja vrednost
0		70		70		70	
		88	71±17	88	71±17	88	71±17
		54		54		54	
MeOH		60		60		60	
		57	60±3	57	60±3	57	60±3
		63		63		63	
0,1		42	49±10	52	59±10	65	55±15
		56		66		44	
0,5		37	40±5	38	52±12	65	65±4
		44		56		70	
1,0		/	62±4	61	68±8	/	77±7
		59		77		72	
4,0		66		64		82	
		60	65±9	63	62±22	/	64±14
		64		95		49	

8.10 GENOTOKSIČNI EFEKAT EKSTRAKATA

Tabela 8.59. Rezultati komet testa za ekstrakte vrsta roda *Allium* na fetalnim fibroblastima pluća (MRC-5)

	Kontrola	<i>t</i> -BOOH	DMSO	FVB	MP	RH	CPVJ	PTB	FBH
C ekstrakta (µg/mL)	0	0,5 mmol/L	0,5 µL/mL	62,5	250	62,5	500	50	15
redni broj	% DNA u repu komete								
1	9,915	33,63	11,95	3,450	0,000	15,01	11,045	0,000	1,198
2	16,86	93,30	0,031	3,864	9,260	18,95	7,694	0,000	0,418
3	0,025	93,56	0,006	0,574	4,714	0,118	0,130	0,000	0,970
4	0,207	0,071	0,000	0,037	0,980	0,432	10,38	0,000	7,955
5	0,074	91,53	0,000	18,86	4,638	1,693	0,000	0,000	1,040
6	6,999	0,000	44,87	13,74	0,002	6,411	18,40	0,000	0,079
7	33,89	16,08	4,935	3,946	0,390	0,090	16,51	0,000	7,101
8	6,286	41,63	13,05	14,74	2,044	21,67	6,632	0,000	11,07
9	9,493	12,04	6,126	9,372	12,10	4,961	0,033	0,000	60,15
10	0,234	93,23	20,08	0,089	9,374	0,025	0,000	0,000	2,054
11	0,219	60,32	20,77	0,005	4,908	0,000	17,592	0,000	0,055
12	1,355	92,25	3,495	0,917	3,306	10,62	0,257	0,037	2,633
13	0,000	23,71	10,25	19,30	0,244	2,624	0,005	0,041	52,00
14	0,009	50,44	10,88	19,67	1,008	26,28	0,325	0,051	11,10
15	0,160	13,05	9,197	0,067	6,010	0,000	2,981	0,093	0,842
16	9,596	19,96	1,072	0,063	0,008	6,796	8,049	0,099	1,254
17	42,11	35,01	0,000	2,292	0,000	0,000	6,645	0,109	12,62
18	0,093	95,05	7,051	2,322	0,081	0,000	0,034	0,118	1,829
19	0,310	41,66	0,004	0,216	0,334	0,365	1,431	0,606	21,90
20	0,017	3,125	17,03	9,161	0,000	0,015	27,65	0,667	0,344
21	0,021	41,83	1,166	12,73	0,089	0,187	0,702	0,822	52,48
22	5,536	21,06	0,322	3,918	4,487	2,685	0,000	0,857	24,56
23	0,000	92,05	0,000	28,99	1,626	0,000	6,090	1,008	0,068
24	0,006	23,63	0,010	0,028	0,550	3,661	0,011	1,064	21,74
25	0,482	13,78	0,137	1,394	43,19	0,010	0,128	1,394	16,67
26	11,05	26,67	5,816	19,24	0,888	0,836	0,039	1,502	7,864
27	11,09	10,92	24,39	15,81	0,096	0,006	0,446	1,538	0,000
28	11,10	15,93	0,373	0,635	3,079	0,063	1,756	1,702	5,678
29	0,018	41,28	0,427	0,000	5,658	7,968	0,017	1,920	2,814
30	2,405	5,875	0,119	0,004	7,721	2,380	3,731	2,441	0,000
31	11,84	30,46	0,094	3,285	0,000	16,63	0,599	2,618	0,725
32	2,471	19,38	0,000	16,30	0,208	3,792	20,39	3,385	19,79
33	0,151	15,30	0,062	6,699	0,033	0,000	7,856	4,894	14,24
34	2,179	54,81	3,453	0,785	0,223	0,002	26,72	5,902	25,58
35	0,850	30,88	6,598	10,95	40,46	8,124	2,105	6,092	16,57
36	0,057	7,808	18,84	0,000	0,636	0,164	5,402	6,146	10,57
37	15,82	12,86	0,047	28,15	12,94	13,05	16,50	6,152	15,40
38	7,839	16,62	0,883	2,444	0,020	0,011	6,380	6,680	0,000
39	0,022	0,055	8,053	1,093	14,50	1,703	9,533	9,957	16,62

	Kontrola	<i>t</i> -BOOH	DMSO	FVB	MP	RH	CPVJ	PTB	FBH
C ekstrakta (µg/mL)	0	0,5 mmol/L	0,5 µL/mL	62,5	250	62,5	500	50	15
redni broj	% DNA u repu komete								
40	0,376	94,00	11,39	8,196	0,008	16,00	2,771	12,38	38,53
41	0,562	94,90	0,000	0,855	0,058	10,20	2,718	14,42	55,65
42	25,99	95,82	0,009	6,331	0,273	0,971	12,70	14,58	12,41
43	20,64	27,95	0,576	0,482	0,334	0,033	90,71	14,59	5,329
44	17,38	93,91	18,77	0,030	0,144	0,000	0,150	15,88	33,33
45	28,05	75,23	0,149	0,003	2,168	0,000	0,120	19,11	14,63
46	0,004	22,37	0,274	7,975	32,35	0,004	10,83	19,44	0,000
47	2,122	6,203	2,193	1,635	11,23	0,043	14,50	20,51	100,0
48	0,194	24,33	0,244	0,090	0,168	0,000	9,961	33,26	92,67
49	0,142	7,293	6,925	0,060	1,865	0,000	0,086	33,43	0,000
50	0,001	26,92	1,028	0,019	35,72	0,127	0,448	42,22	1,590

Tabela 8.60. Rezultati komet testa za ekstrakte vrsta roda *Allium* na ćelijama adenokarcinoma debelog creva (HT-29)

	control	<i>t</i> -BOOH	DMSO	FVB	MP	RH	CPVJ	PTB	FBH
C ekstrakta (µg/mL)	0	0,5 mmol/L	0,5 µL/mL	62,5	70	80	100	30	15
redni broj	% DNA u repu komete								
1	8,775	0,000	6,379	6,930	0,791	26,36	5,054	0,000	5,445
2	1,726	2,112	1,395	2,797	0,321	15,99	0,000	0,065	0,208
3	8,524	0,023	25,59	1,292	0,000	16,05	23,45	0,016	20,92
4	0,886	0,000	16,11	17,04	5,451	6,477	0,204	13,29	4,504
5	2,084	6,433	10,11	44,39	10,35	5,591	0,069	0,000	0,561
6	14,60	93,06	1,672	0,349	2,442	0,119	0,000	0,030	17,80
7	9,299	92,98	1,052	1,110	0,245	2,938	7,456	16,39	4,457
8	1,215	87,28	8,046	7,853	9,673	0,224	26,17	0,600	0,163
9	3,259	1,817	7,581	11,28	1,312	0,280	0,554	21,46	6,184
10	1,619	92,58	2,604	5,178	0,448	3,704	2,274	0,377	0,654
11	0,017	93,14	12,50	9,950	5,368	29,84	0,000	67,74	15,95
12	13,15	91,71	22,20	25,33	0,468	2,108	0,197	0,844	7,204
13	42,29	94,94	7,090	28,90	15,37	0,104	1,289	0,000	9,500
14	10,27	93,79	42,44	10,81	1,507	8,859	9,598	12,00	18,98
15	19,76	6,533	21,52	10,93	6,258	18,57	18,79	0,384	11,55
16	3,571	4,711	1,071	8,182	20,24	7,176	13,97	26,59	17,93
17	7,998	91,92	5,656	34,16	4,075	11,04	0,720	29,53	3,936
18	14,80	92,31	47,06	6,423	1,696	27,88	11,52	26,78	0,020
19	16,85	0,140	0,256	13,10	1,964	16,96	1,450	0,000	0,396
20	10,44	93,21	18,19	0,361	0,428	32,54	9,941	0,295	10,02
21	8,554	93,99	31,05	4,991	0,043	4,898	0,162	15,20	11,77
22	0,340	88,18	58,68	8,731	10,77	16,10	4,305	12,23	0,284
23	4,995	87,61	13,00	1,587		8,017	7,582	0,000	5,740
24	8,265	24,85	22,46	8,674	1,937	29,26	0,000	46,50	25,74

	control	<i>t</i> -BOOH	DMSO	FVB	MP	RH	CPVJ	PTB	FBH
C ekstrakta (µg/mL)	0	0,5 mmol/L	0,5 µL/mL	62,5	70	80	100	30	15
redni broj	% DNA u repu komete								
25	2,096	5,344	5,753	8,309	3,438	14,54	1,461	0,045	0,348
26	0,000	2,389	5,529	2,684	0,472	0,325	0,107	14,04	6,043
27	0,117	4,639	15,72	11,71	0,000	15,84	1,751	22,14	3,989
28	17,75	96,01	0,811	23,75	0,030	2,352	0,000	29,13	7,251
29	12,80	65,31	33,32	24,33	11,92	11,71	29,09	4,178	0,000
30	16,82	61,50	6,548	10,68	1,889	56,88	18,02	0,921	12,72
31	4,655	11,98	1,219	6,307	0,582	0,019	0,000	8,906	0,254
32	17,07	16,06	19,61	2,535	1,442	1,310	4,310	0,034	0,819
33	5,352	93,75	15,47	0,035	0,246	9,637	2,297	10,53	0,957
34	9,867	0,114	2,521	3,963	10,69	0,000	1,863	17,90	0,545
35	1,024	94,97	7,411	13,78	0,392	27,03	6,972	5,952	0,042
36	16,16	95,21	11,65	12,27	4,993	2,178	1,109	0,000	4,388
37	0,010	95,13	7,493	33,83	1,233	3,010	5,213	3,166	29,43
38	0,142	0,828	8,350	0,469	0,037	22,69	15,03	6,882	5,24
39	0,063	94,99	2,252	11,26	3,300	7,951	0,051	0,942	20,38
40	0,648	3,868	17,25	1,549	3,300	31,67		2,299	10,39
41	15,11	0,039	0,004	0,125	4,431	14,74	1,713	0,000	7,697
42	6,157	93,21	13,55	8,390	0,458	5,572	0,032	3,589	18,22
43	5,370	94,96	10,24	45,92	16,01	1,854	0,000	8,318	0,000
44	6,518	91,77	12,74	12,26	9,906	32,71	5,301	0,017	39,42
45	0,817	0,369	3,271	28,36	0,372	12,90	11,17	0,917	0,000
46	3,900	94,14	10,97	0,148		1,155	20,54	12,04	0,000
47	3,308	1,281	0,352	1,180	14,86	20,38	30,21	9,164	19,49
48	13,57	73,66	1,325	0,000	9,881	0,071	/	0,156	12,20
49	5,373	97,13	0,159	0,142	1,097	45,52	/	2,702	0,037
50	0,121	91,22	0,366	19,74	15,18	20,49	/	26,92	2,072
51	93,99	/	/	7,985	0,327	6,154	/	/	/

8.11 UTICAJ EKSTRAKATA NA RAST ZDRAVIH I TUMORSKIH ČELIJA

Tabela 8.61. Uticaj ekstrakata *A. flavum*, *A. melanatherum* i *A. carinatum* subsp. *carinatum* na rast fetalnih fibroblasta pluća (MRC-5)

MRC-5	Absorbancija (A)								Procenat od kontole (K) [%]								srednja vrednost	
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆	K ₇	K ₈		
C [µg mL⁻¹]^a																		
<i>A. flavum</i> , Babušnica, cela biljka																		
62,5	0,661	1,01	0,999	0,948	0,918	0,957	0,973	1,047	56,3	86,1	85,1	80,8	78,2	81,6	82,9	89,2	83,43	
125	0,293	0,381	0,453	0,569	0,544	0,534	0,339	0,283	25,0	32,5	38,6	48,5	46,4	45,5	28,9	24,1	37,78	
250	0,098	0,092	0,248	0,168	0,214	0,177	0,115	0,099	8,35	7,84	21,1	14,3	18,2	15,1	9,80	8,44	13,55	
500	0,039	0,054	0,089	0,089	0,106	0,070	0,079	0,070	3,32	4,60	7,59	7,59	9,03	5,97	6,73	5,97	6,78	
1000	0,045	0,082	0,079	0,105	0,102	0,079	0,082	0,083	3,84	6,99	6,73	8,95	8,69	6,73	6,99	7,07	7,45	
kontrola	1,106	1,166	1,172	1,236	1,24	1,139	1,122	1,205										
									IC₅₀ [µg mL⁻¹]									
									72,4	103	100	122	117	116	92,7	89,3	106±12,88	
C [µg mL⁻¹]^a																		
<i>A. flavum</i> , Babušnica, nadzemni deo																		
3,91	1,22	1,319	1,213	1,301	1,254	1,354	1,323	1,183	92,1	99,2	91,2	97,8	94,3	101,8	99,5	89,0	95,6	
7,81	1,311	1,351	1,402	1,231	1,298	1,273	1,305	1,243	98,6	101,6	105,4	92,6	97,6	95,7	98,1	93,5	97,9	
15,6	1,369	1,455	1,203	1,359	1,354	1,318	1,239	1,245	103,0	109,4	90,5	102,2	101,8	99,1	93,2	93,6	99,1	
31,2	0,514	0,733	0,780	0,493	0,510	0,706	0,728	0,562	38,7	55,1	58,7	37,1	38,4	53,1	54,7	42,3	47,2	
62,5	0,387	0,255	0,521	0,568	0,410	0,440	0,408	0,623	29,1	19,2	39,2	42,7	30,8	33,1	30,7	46,9	34,0	
kontrola	1,376	1,260	1,367	1,303	1,437	1,302	1,328	1,265										
									IC₅₀ [µg mL⁻¹]									
									25,76	31,20	35,42	25,23	25,73	31,46	33,02	23,76	29,4±4,46	
C [µg mL⁻¹]^a																		
<i>A. melanatherum</i> , Plana, cela biljka																		
62,5	1,095	1,127	1,09	1,081	1,141	1,128	1,149	1,178	93,3	96,1	92,9	92,1	97,2	96,1	97,9	100	96,13	
125	1,057	1,099	1,084	1,099	1,093	1,144	1,091	1,087	90,1	93,7	92,4	93,7	93,2	97,5	93,0	92,6	93,22	
250	0,905	1,042	0,93	1,12	1,174	0,919	0,966	1,045	77,1	88,8	79,3	95,5	100	78,3	82,3	89,1	82,49	
500	0,156	0,12	0,173	0,193	0,193	0,116	0,283	0,229	13,3	10,2	14,7	16,4	16,4	9,89	24,1	19,5	15,30	
1000	0,077	0,088	0,126	0,141	0,159	0,094	0,089	0,094	6,56	7,50	10,7	12,0	13,5	8,01	7,59	8,01	8,07	
kontrola	1,106	1,166	1,172	1,236	1,24	1,139	1,122	1,205										
									IC₅₀ [µg mL⁻¹]									
									343	359	341	469	471	260	386	391	347±47,41	
C [µg mL⁻¹]^a																		
<i>A. melanatherum</i> , Plana, nadzemni deo																		
7,81	1,197	1,124	1,165	1,234	1,137	1,301	1,343	1,293	93,6	87,9	91,1	96,5	88,9	102	105	101	95,7	
15,6	1,270	1,198	1,264	1,132	1,354	1,268	1,305	1,271	99,3	93,7	98,8	88,5	106	99,1	102	99,4	98,3	
31,2	1,166	1,116	1,043	1,146	1,209	1,244	1,305	1,332	91,2	87,3	81,5	89,6	94,5	97,3	102	104	93,4	
62,5	1,104	1,192	1,103	1,148	1,098	1,216	1,181	1,297	86,3	93,2	86,2	89,8	85,8	95,1	92,3	101	91,3	
125	0,991	1,074	1,101	0,965	1,081	1,024	1,144	0,919	77,5	84,0	86,1	75,4	84,5	80,1	89,4	71,9	81,1	
kontrola	1,130	1,216	1,397	1,272	1,282	1,323	1,262	1,350										
									IC₅₀ [µg mL⁻¹]									
									/	/	/	/	/	/	/	/	>125	
C [µg mL⁻¹]^a																		
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i> , Čemernik, cela biljka																		
62,5	1,150	1,010	1,130	1,156	1,192	1,180	1,203	1,174	107	94,2	105	108	111	110	112	109	107	
125	1,216	1,105	1,257	1,205	1,188	1,157	1,165	1,211	113	103	117	112	111	108	109	113	111	
250	1,179	1,126	1,180	1,284	1,274	1,114	1,220	1,231	110	105	110	120	119	104	114	115	112	
500	0,245	0,354	0,666	0,869	0,835	0,547	0,486	0,339	22,8	33,0	62,1	81,0	77,8	51,0	45,3	31,6	50,6	
1000	0,110	0,116	0,169	0,124	0,138	0,146	0,143	0,108	10,3	10,8	15,8	11,6	12,9	13,6	13,3	10,1	12,3	
kontrola	1,042	/	1,098	1,090	1,073	1,059	1,073	1,153										
									IC₅₀ [µg mL⁻¹]									
									452	489	525	517	515	504	497	489	498±23,12	

^a Radna koncentracija ekstrakta

Tabela 8.62. Uticaj ekstrakata *A. carinatum* subsp. *pulchelum*, *A. fuscum* i *A. pallens* na rast fetalnih fibroblasta pluća (MRC-5)

MRC-5	Absorbancija (A)								Procenat od kontole (K) [%]								srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆	K ₇	K ₈	
C [µg mL⁻¹]^a	<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchelum</i>, Vlasinsko jezero, cela biljka																
62,5	1,066	1,074	1,046	1,09	1,063	1,117	1,099	1,026	102	103	100	104	102	107	105	98,1	103
125	0,989	0,887	0,989	1,069	0,892	0,989	1,036	1,000	94,6	84,8	94,6	102	85,3	94,6	99,1	95,6	93,8
250	1,065	0,879	1,111	0,980	1,052	1,234	0,870	0,934	101,8	84,0	106	93,7	100	118	83,2	89,3	87,6
500	0,120	0,187	0,147	0,207	0,147	0,169	0,171	0,130	11,5	17,9	14,1	19,8	14,1	16,2	16,3	12,4	15,3
1000	0,070	0,122	0,103	0,137	0,125	0,147	0,153	0,076	6,69	11,7	9,85	13,1	12,0	14,1	14,6	7,27	11,1
kontrola	0,944	0,988	1,021	1,134	1,092	1,239	1,025	0,924									
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								322	365	328	383	300	326	336	368	341±28,11
C [µg mL⁻¹]^a	<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchelum</i>, Vlasinsko jezero, nadzemni deo																
7,81	1,177	1,17	1,196	1,199	1,225	1,273	1,245	1,231	101	101	103	103	106	110	107	106	105
15,6	1,203	1,301	1,278	1,240	1,256	1,163	1,283	1,169	104	112	110	107	108	100	111	101	107
31,2	1,143	1,199	1,207	1,087	1,285	1,216	1,191	1,177	98,6	103	104	93,8	111	105	103	101	103
62,5	1,275	1,21	1,382	1,342	1,197	1,189	1,181	1,076	110	104	119	116	103	103	102	92,8	106
125	1,240	1,101	1,278	1,257	1,181	1,170	1,065	1,242	107	95,0	110	108	102	101	91,9	107	103
kontrola	1,071	1,081	1,258	1,037	1,146	1,271	1,231	1,178	101	101	103	103	106	110	107	106	105
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								/	/	/	/	/	/	/	/	>125
C [µg mL⁻¹]^a	<i>A. fuscum</i> var. <i>fuscum</i>, Zaovine, cela biljka																
62,5	1,349	1,438	1,469	1,458	1,458	1,49	1,408	1,480	100	107	109	108	108	111	104	110	107
125	1,198	1,341	1,288	1,279	1,417	1,351	1,320	1,359	88,9	99,5	95,6	94,9	105	100	98,0	101	97,9
250	0,678	0,721	1,136	0,699	0,641	0,687	0,744	0,616	50,3	53,5	84,3	51,9	47,6	51,0	55,2	45,7	54,9
500	0,186	0,170	0,183	0,194	0,174	0,246	0,222	0,170	13,8	12,6	13,6	14,4	12,9	18,3	16,5	12,6	14,3
1000	0,093	0,121	0,085	0,114	0,115	0,144	0,136	0,083	6,90	8,98	6,31	8,46	8,53	10,7	10,1	6,16	8,27
kontrola	1,298	1,294	1,290	1,418	1,353	1,352	1,331	1,444									
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								254	258	351	258	247	254	265	242	254±7,70
C [µg mL⁻¹]^a	<i>A. fuscum</i> var. <i>fuscum</i>, Zaovine, nadzemni deo																
62,5	1,153	1,217	1,238	1,164	1,155	1,184	1,210	1,313	90,1	95,2	96,8	91,0	90,3	92,6	94,6	103	94,2
125	1,127	1,212	1,293	1,178	1,176	1,180	1,204	1,250	88,1	94,8	101	92,1	91,9	92,3	94,1	97,7	94,0
250	0,759	0,744	0,932	0,744	0,582	1,018	0,541	0,475	59,3	58,2	72,9	58,2	45,5	79,6	42,3	37,1	56,6
500	0,272	0,214	0,292	0,454	0,302	0,293	0,269	0,196	21,3	16,7	22,8	35,5	23,6	22,9	21,0	15,3	22,4
1000	0,090	0,097	0,088	0,111	0,09	0,109	0,136	0,088	7,04	7,58	6,88	8,68	7,04	8,52	10,63	6,88	7,91
kontrola	1,130	1,216	1,397	1,272	1,282	1,323	1,262	1,350									
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								305	282	353	349	248	379	241	229	298±53,63
C [µg mL⁻¹]^a	<i>A. pallens</i>, Beli Rzav, cela biljka																
62,5	0,781	0,877	0,955	1,008	0,983	0,957	0,989	0,989	83,0	93,2	101	107	104	102	105	105	100
125	0,806	0,882	0,919	0,983	0,989	0,972	0,983	0,900	85,6	93,7	97,6	104	105	103,3	104	95,6	98,7
250	0,812	0,976	0,880	1,037	0,952	0,843	0,923	1,022	86,3	104	93,5	110	101	89,5	98,0	108	93,7
500	0,405	0,666	0,783	0,904	0,872	0,888	0,598	0,686	43,0	70,7	83,2	96,0	92,6	94,3	63,5	72,9	74,6
1000	0,169	0,105	0,101	0,145	0,117	0,106	0,130	0,143	18,0	11,2	10,7	15,4	12,4	11,3	13,8	15,2	13,5
kontrola	0,828	0,893	0,901	1,036	0,992	1,001	0,896	0,984									
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								495	665	808	758	862	587	569	649	646±74,7

^a Radna koncentracija ekstrakta

Tabela 8.63. Uticaj ekstrakata *A. oleraceum*, *A. paniculatum* i *A. rhodopeum* na rast fetalnih fibroblasta pluća (MRC-5)

MRC-5	Absorbancija (A)								Procenat od kontole (K) [%]								srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆	K ₇	K ₈	
C [µg mL⁻¹]^a																	
<i>A. oleraceum</i> , Kosmovac, cela biljka																	
62,5	1,419	1,321	1,382	1,425	1,512	1,409	1,442	1,405	105	98,0	103	106	112	105	107	104	107
125	1,24	1,27	1,279	1,315	1,235	1,288	1,24	1,32	92,0	94,2	94,9	97,6	91,7	95,6	92,0	98,0	93,8
250	1,251	1,309	1,275	1,339	1,305	1,309	1,325	1,365	92,8	97,1	94,6	99,4	96,8	97,1	98,3	101,3	96,9
500	0,278	0,456	0,604	0,242	0,382	0,31	0,31	0,293	20,6	33,8	44,8	18,0	28,3	23,0	23,0	21,7	22,6
1000	0,098	0,083	0,091	0,106	0,096	0,075	0,104	0,083	7,27	6,16	6,75	7,87	7,12	5,57	7,72	6,16	7,11
kontrola	1,298	1,294	1,29	1,418	1,353	1,352	1,331	1,444									
IC₅₀ [µg mL⁻¹]									403	490	484	415	427	427	432	478	421±12,01
C [µg mL⁻¹]^a																	
<i>A. paniculatum</i> , Titelski breg, cela biljka																	
62,5	0,774	1,031	0,922	1,007	0,903	1,155	1,167	1,087	74,0	98,6	88,2	96,3	86,3	110,4	111,6	103,9	97,3
125	0,703	0,635	0,885	0,79	0,469	0,706	0,668	0,503	67,2	60,7	84,6	75,5	44,8	67,5	63,9	48,1	61,1
250	0,195	0,197	0,276	0,161	0,15	0,174	0,157	0,11	18,6	18,8	26,4	15,4	14,3	16,6	15,0	10,5	15,6
500	0,066	0,062	0,059	0,043	0,049	0,052	0,073	0,045	6,31	5,93	5,64	4,11	4,69	4,97	6,98	4,30	5,33
1000	0,067	0,069	0,079	0,048	0,058	0,047	0,082	0,056	6,41	6,60	7,55	4,59	5,55	4,49	7,84	5,35	5,83
kontrola	0,774	1,031	0,922	1,007	0,903	1,155	1,167	1,087									
IC₅₀ [µg mL⁻¹]									176	146	214	170	115	154	146	122	147±22,81
C [µg mL⁻¹]^a																	
<i>A. paniculatum</i> , Titelski breg, nadzemni deo																	
7,81	1,315	1,195	1,329	1,221	1,399	1,443	1,33	1,296	98,9	89,9	99,9	91,8	105	108	100	97,5	99,0
15,6	1,237	1,398	1,190	1,276	1,208	1,322	1,342	1,292	93,0	105	89,5	96,0	90,8	99,4	101	97,2	96,5
31,2	1,255	1,256	1,164	1,242	1,282	1,323	1,196	1,407	94,4	94,5	87,5	93,4	96,4	99,5	89,9	106	95,2
62,5	1,223	1,167	1,229	1,081	1,218	1,302	1,194	1,113	92,0	87,8	92,4	81,3	91,6	97,9	89,8	83,7	89,6
125	0,963	0,966	1,100	1,071	0,962	1,214	1,120	1,151	72,4	72,6	82,7	80,5	72,3	91,3	84,2	86,6	80,3
kontrola	1,376	1,260	1,367	1,303	1,437	1,302	1,328	1,265									
IC₅₀ [µg mL⁻¹]									/	/	/	/	/	/	/	/	>125
C [µg mL⁻¹]^a																	
<i>A. rhodopeum</i> , Dimitrovgrad, cela biljka																	
62,5	0,563	0,942	1,193	0,991	0,767	1,040	1,174	0,789	51,94	86,90	110,06	91,42	70,76	95,94	108,30	72,79	86,0
125	0,539	0,611	0,797	0,893	0,654	/	0,531	/	49,72	56,37	73,52	82,38	60,33	0,00	48,99	0,00	46,1
250	0,099	0,185	0,097	0,272	0,503	0,085	0,200	0,227	9,13	17,07	8,95	25,09	46,40	7,84	18,45	20,94	19,2
500	0,064	0,056	0,053	0,081	0,077	0,050	0,055	0,051	5,90	5,17	4,89	7,47	7,10	4,61	5,07	4,70	5,62
1000	0,047	0,046	0,062	0,053	0,074	0,062	0,064	0,045	4,34	4,24	5,72	4,89	6,83	5,72	5,90	4,15	5,22
kontrola	1,042	/	1,098	1,090	1,073	1,059	1,073	1,153									
IC₅₀ [µg mL⁻¹]									123	137	147	490	235	161	124	132	137±14,63
C [µg mL⁻¹]^a																	
<i>A. rhodopeum</i> , Dimitrovgrad, nadzemni deo																	
7,81	1,064	1,263	1,247	1,308	1,242	1,316	1,231	1,118	91,8	109	108	113	107	113	106	96,5	102
15,6	1,179	1,164	1,135	1,247	1,067	1,151	1,174	1,261	102	100	97,9	108	92,1	99,3	101	109	100
31,2	1,216	1,235	1,204	1,194	1,217	1,231	1,229	1,277	105	106	104	103	105	106	106	110	107
62,5	1,195	1,144	1,156	1,191	1,102	1,233	1,178	1,203	103	98,7	99,7	103	95,1	106	102	104	102
125	0,293	0,636	0,584	0,688	0,501	0,558	0,634	0,363	25,3	54,9	50,4	59,4	43,2	48,1	54,7	31,3	37,0
kontrola	1,071	1,081	1,258	1,037	1,146	1,271	1,231	1,178									
IC₅₀ [µg mL⁻¹]									90,7	/	/	/	70,7	123	/	73,8	89,6±24,0

^a Radna koncentracija ekstrakta

Tabela 8.64. Uticaj ekstrakata *A. cepa*, *A. sativum* i standardnih fenolnih jedinjenja na rast fetalnih fibroblasta pluća (MRC-5)

MRC-5	Absorbancija (A)								Procenat od kontole (K) [%]								srednja vrednost	
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆	K ₇	K ₈		
C [µg mL⁻¹]^a	<i>A. cepa</i>, Nedadin, cela biljka																	
62,5	1,293	1,405	1,247	1,295	1,236	1,360	1,320	1,29	95,8	104	92,4	96,0	91,6	101	97,8	95,6	96,8	
125	1,169	1,229	1,274	1,198	1,18	1,352	1,167	1,317	86,6	91,1	94,4	88,8	87,5	100	86,5	97,6	91,6	
250	1,208	1,251	1,213	1,337	1,326	1,272	1,214	1,315	89,5	92,7	89,9	99,1	98,3	94,3	90,0	97,5	93,9	
500	1,148	1,161	1,234	1,055	1,176	1,244	1,172	1,224	85,1	86,1	91,5	78,2	87,2	92,2	86,9	90,7	87,2	
1000	1,024	1,064	1,085	1,122	0,995	1,157	1,080	1,09	75,9	78,9	80,4	83,2	73,8	85,8	80,1	80,8	79,8	
kontrola	1,331	1,358	1,274	1,313	1,418	1,366	1,364	1,369										
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								/	/	/	/	/	/	/	/	/	>1000
C [µg mL⁻¹]^a	<i>A. sativum</i>, Šajkaš, cela biljka																	
62,5	1,233	1,309	1,343	1,287	1,331	1,384	1,375	1,395	91,4	97,0	99,5	95,4	98,7	102	101	103	98,7	
125	1,258	1,273	1,262	1,208	1,256	1,312	1,281	1,387	93,2	94,4	93,5	89,5	93,1	97,2	95,0	102	94,8	
250	1,148	1,241	1,23	1,301	1,241	1,379	1,337	1,354	85,1	92,0	91,2	96,4	92,0	102	99,1	100	94,8	
500	1,463	1,474	1,433	1,427	1,430	1,444	1,422	1,445	108	109	106	106	106	107	105	107	106	
1000	1,205	1,136	1,196	1,269	1,232	1,333	1,280	1,280	89,3	84,2	88,7	94,1	91,3	98,8	94,9	94,9	92,0	
kontrola																		
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								/	/	/	/	/	/	/	/	/	>1000
C [µg mL⁻¹]^a	ferulna kiselina																	
31,25	0,547	0,529	0,529	0,626	0,565	0,584	0,630	0,536	85,5	82,7	82,7	97,8	88,3	91,3	98,4	83,8	91,1	
62,5	0,542	0,461	0,561	0,562	0,541	0,526	0,505	0,511	84,7	72,0	87,7	87,8	84,5	82,2	78,9	79,8	84,3	
125	0,516	0,498	0,605	0,362	0,612	0,571	0,633	0,445	80,6	77,8	94,5	56,6	95,6	89,2	98,9	69,5	84,0	
250	0,389	0,508	0,355	0,434	0,624	0,299	0,484	0,541	60,8	79,4	55,5	67,8	97,5	46,7	75,6	84,5	61,3	
500	0,230	0,250	0,248	0,183	0,281	0,161	0,179	0,148	35,9	39,1	38,8	28,6	43,9	25,2	28,0	23,1	31,3	
kontrola	0,641	0,628	0,655	0,659	0,589	0,673	0,647	0,628										
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								306	466	253	288	404	248	262	457	272±24,6	
C [µg mL⁻¹]^a	kvercetin																	
7,81	0,696	0,642	0,620	0,574	0,622	0,601	0,572	0,631	60,7	56,0	54,1	50,1	54,3	52,4	49,9	55,0	54,1	
15,6	0,512	0,513	0,501	0,553	0,531	0,560	0,516	0,541	44,7	44,7	43,7	48,2	46,3	48,8	45,0	47,2	46,1	
31,2	0,338	0,365	0,234	0,377	0,339	0,445	0,418	0,495	29,5	31,8	20,4	32,9	29,6	38,8	36,5	43,2	32,8	
62,5	0,682	0,242	0,255	0,232	0,240	0,299	0,229	0,238	/	21,1	22,2	20,2	20,9	26,1	20,0	20,8	21,6	
kontrola	1,056	1,193	1,342	1,027	1,136	1,257	0,926	1,234										
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								13,2	10,1	7,99	7,99	11,9	12,6	/	14,8	11,2±2,62	

^a Radna koncentracija ekstrakta

Tabela 8.65. Uticaj ekstrakata *A. flavum*, *A. melantherum* i *A. carinatum* subsp. *carinatum* na rast ćelija epitelnog karcinoma cerviksa (HeLa)

HeLa	Absorbancija (A)								Procenat od kontole (K) [%]								srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆	K ₇	K ₈	
C [µg mL⁻¹]^a																	
<i>A. flavum</i> , Babušnica, cela biljka																	
62,5	0,783	0,639	0,782	0,702	0,845	0,812	0,969	0,695	63,0	51,4	62,9	56,4	67,9	65,3	77,9	55,9	62,6
125	0,276	0,311	0,574	0,552	0,219	0,155	0,297	0,216	22,2	25,0	46,2	44,4	17,6	12,5	23,9	17,4	26,1
250	0,125	0,184	0,184	0,081	0,104	0,102	0,186	0,134	10,0	14,8	14,8	6,51	8,36	8,20	15,0	10,8	11,1
500	0,105	0,088	0,089	0,103	0,109	0,104	0,114	0,088	8,44	7,08	7,16	8,28	8,76	8,36	9,17	7,08	8,04
1000	0,100	0,085	0,103	0,110	0,100	0,105	0,099	0,082	8,04	6,83	8,28	8,85	8,04	8,44	7,96	6,59	7,88
kontrola	1,242	1,234	1,185	1,314	1,291	1,185	1,284	1,214									
									IC₅₀ [µg mL⁻¹]								92,6±23,5
<i>A. flavum</i> , Babušnica, nadzemni deo																	
3,10	2,212	2,234	2,45	2,653	2,602	2,469	2,375	2,493	92,2	93,1	102	111	108	103	99,0	104	101
7,81	2,380	2,419	2,833	2,106	2,399	2,247	2,474	2,450	99,2	101	118	87,8	100	93,6	103	102	101
15,6	2,368	2,676	2,419	2,204	2,123	2,394	/	/	98,7	111	101	91,9	88,5	99,8	/	/	98,5
31,2	1,359	1,908	1,828	1,862	2,284	2,122	2,056	/	56,6	79,5	76,2	77,6	95,2	88,4	85,7	/	79,9
62,5	0,330	0,563	0,482	0,442	0,394	0,371	0,806	0,506	13,8	23,5	20,1	18,4	16,4	15,4	33,6	21,1	20,3
kontrola	2,282	2,246	2,280	2,540	2,477	2,272	2,533	2,566									
									IC₅₀ [µg mL⁻¹]								42,3±10,4
<i>A. melantherum</i> , Plana, cela biljka																	
62,5	1,082	1,176	1,375	1,299	1,332	1,255	1,274	1,242	87,0	94,6	111	104	107	101	102	99,9	98,6
125	1,075	1,257	1,237	1,171	1,201	1,236	1,064	1,124	86,4	101	99,5	94,2	96,6	99,4	85,6	90,4	93,2
250	0,687	0,746	1,149	1,016	0,615	0,637	0,673	0,696	55,2	60,0	92,4	81,7	49,5	51,2	54,1	56,0	54,3
500	0,335	0,253	0,557	0,196	0,200	0,244	0,138	0,351	26,9	20,3	44,8	15,8	16,1	19,6	11,1	28,2	20,4
1000	0,139	0,108	0,132	0,180	0,118	0,111	0,101	0,149	11,2	8,68	10,6	14,5	9,49	8,93	8,12	12,0	9,73
kontrola	1,242	1,234	1,185	1,314	1,291	1,185	1,284	1,214									
									IC₅₀ [µg mL⁻¹]								271±19,1
<i>A. melantherum</i> , Plana, nadzemni deo																	
7,81	2,235	2,467	2,437	2,419	2,01	2,597	2,209	2,295	108	119	118	117	97	126	107	111	113
15,6	2,208	2,366	2,616	2,675	1,996	2,323	2,276	2,262	107	114	126	129	96	112	110	109	113
31,2	2,408	2,416	2,879	2,518	2,694	2,513	2,500	2,479	116	117	139	122	130	121	121	120	123
62,5	2,135	2,419	2,394	2,464	2,012	2,284	2,024	2,203	103	117	116	119	97	110	98	106	108
125	1,841	1,758	2,242	2,533	2,171	2,045	2,365	2,111	89	85	108	122	105	99	114	102	103
kontrola	1,831	2,104	2,186	2,057	2,151	2,026	2,048	2,148									
									IC₅₀ [µg mL⁻¹]								>125
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i> , Čemernik, cela biljka																	
62,5	1,243	1,164	1,206	1,256	1,338	1,21	1,245	1,13	99,9	93,6	97,0	101	108	97,3	100	90,8	98,0
125	1,24	1,318	1,221	1,213	1,279	1,233	1,137	1,164	99,7	106	98,2	97,5	103	99,1	91,4	93,6	98,7
250	0,882	1,093	1,051	0,679	1,151	0,976	0,977	0,845	70,9	87,9	84,5	54,6	92,5	78,5	78,5	67,9	80,1
500	0,444	0,437	0,359	0,214	0,294	0,528	0,32	0,424	35,7	35,1	28,9	17,2	23,6	42,4	25,7	34,1	32,2
1000	0,132	0,113	0,139	0,136	0,133	0,124	0,101	0,094	10,6	9,08	11,2	10,9	10,7	10,0	8,12	7,56	9,60
kontrola	1,171	1,209	1,201	1,342	1,242	1,295	1,258	1,233									
									IC₅₀ [µg mL⁻¹]								404±27,4

^a Radna koncentracija ekstrakta

Tabela 8.66. Uticaj ekstrakata *A. carinatum* subsp. *pulchelum*, *A. fuscum* i *A. pallens* na rast ćelija epitelnog karcinoma cerviksa (HeLa)

HeLa	Absorbancija (A)								Procenat od kontole (K) [%]								srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆	K ₇	K ₈	
C [µg mL⁻¹]^a																	
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchelum</i> , Vlasinsko jezero, cela biljka																	
62,5	0,662	0,766	0,716	0,668	0,783	0,702	0,725	0,759	93,0	108	101	93,8	110	98,6	102	107	102
125	0,745	0,716	0,595	0,632	0,567	0,484	0,797	0,803	105	101	83,6	88,8	79,6	68,0	112	113	95,2
250	0,502	0,45	0,592	0,519	0,404	0,487	0,304	0,371	70,5	63,2	83,1	72,9	56,7	68,4	42,7	52,1	60,9
500	0,076	0,088	0,117	0,107	0,133	0,047	0,068	0,066	10,7	12,4	16,4	15,0	18,7	6,60	9,55	9,27	11,7
1000	0,03	0,038	0,032	0,035	0,041	0,035	0,047	0,032	4,21	5,34	4,49	4,92	5,76	4,92	6,60	4,49	5,18
kontrola	0,697	0,648	0,706	0,728	0,716	0,753	0,734	0,714									
IC₅₀ [µg mL⁻¹]									257	291	372	337	262	303	248	251	278±33,2
C [µg mL⁻¹]^a																	
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchelum</i> , Vlasinsko jezero, nadzemni deo																	
7,81	2,381	2,778	2,575	2,489	2,349	2,656	2,67	2,852	96,8	113	105	101	95,5	108	109	116	105
15,6	2,954	3,182	2,325	2,618	2,798	3,181	2,722	2,527	120	129	94,5	106	114	129	111	103	113
31,2	2,941	3,008	2,651	2,796	2,497	2,301	2,696	2,629	120	122	108	114	101	93,6	110	107	109
62,5	2,870	2,737	2,692	2,276	2,421	2,611	2,600	2,752	117	111	109	92,5	98,4	106	106	112	106
125	2,643	2,490	2,950	2,199	2,304	2,617	2,560	2,082	107	101	120	89,4	93,6	106	104	84,6	101
kontrola	2,486	2,599	2,448	2,664	2,390	2,468	2,365	2,264									
IC₅₀ [µg mL⁻¹]									/	/	/	/	/	/	/	/	>125
C [µg mL⁻¹]^a																	
<i>A. fuscum</i> var. <i>fuscum</i> , Zaovine, cela biljka																	
62,5	0,73	0,834	0,825	0,723	0,797	0,709	0,903	0,729	86,9	99,3	98,2	86,0	94,9	84,4	107	86,8	93,0
125	0,682	0,744	0,878	0,771	0,808	0,753	0,796	0,830	81,2	88,5	104	91,8	96,2	89,6	94,7	98,8	93,2
250	0,621	0,450	0,593	0,548	0,565	0,527	0,461	0,393	73,9	53,6	70,6	65,2	67,2	62,7	54,9	46,8	61,9
500	0,088	0,085	0,076	0,082	0,097	0,087	0,076	0,093	10,5	10,1	9,0	9,8	11,5	10,4	9,0	11,1	10,2
1000	0,033	0,031	0,027	0,029	0,029	0,029	0,035	0,036	3,93	3,69	3,21	3,45	3,45	3,45	4,17	4,28	3,70
kontrola	0,850	0,766	0,835	0,808	0,886	0,975	0,821	0,781									
IC₅₀ [µg mL⁻¹]									340	263	256	299	308	296	265	249	285±31,5
C [µg mL⁻¹]^a																	
<i>A. fuscum</i> var. <i>fuscum</i> , Zaovine, nadzemni deo																	
62,5	0,851	0,953	0,787	0,802	0,906	0,767	0,787	0,774	101	113	93,1	94,8	107	90,7	93,1	91,5	96,6
125	0,883	0,777	0,912	0,912	0,89	0,878	0,813	0,809	104	91,9	108	108	105	104	96,1	95,7	101
250	0,387	0,457	0,459	0,670	0,586	0,500	0,507	0,261	45,8	54,0	54,3	79,2	69,3	59,1	60,0	30,9	54,8
500	0,045	0,046	0,043	0,054	0,150	0,044	0,048	0,046	5,32	5,44	5,08	6,39	17,74	5,20	5,68	5,44	5,51
1000	0,021	0,032	0,028	0,031	0,028	0,031	0,032	0,030	2,48	3,78	3,31	3,67	3,31	3,67	3,78	3,55	3,46
kontrola	0,784	0,906	0,872	0,849	0,835	0,885	0,840	0,794									
IC₅₀ [µg mL⁻¹]									249	257	251	260	325	253	253	244	252±5,08
C [µg mL⁻¹]^a																	
<i>A. pallens</i> , Beli Rzav, cela biljka																	
62,5	0,630	0,649	0,89	0,787	0,761	0,917	0,781	0,866	78,0	80,4	110	97,4	94,2	113	96,7	107	93,2
125	0,712	0,657	0,714	0,778	0,838	0,884	0,814	0,824	88,2	81,3	88,4	96,3	104	109	101	102	98,0
250	0,627	0,837	0,812	0,670	0,759	0,813	0,701	0,748	77,6	104	100	83,0	94,0	101	86,8	92,6	88,1
500	0,395	0,747	0,702	0,665	0,520	0,696	0,685	0,436	48,9	92,5	86,9	82,3	64,4	86,2	84,8	54,0	55,8
1000	0,055	0,049	0,049	0,057	0,063	0,071	0,057	0,060	6,81	6,07	6,07	7,06	7,80	8,79	7,06	7,43	7,35
kontrola	0,836	0,908	0,746	0,821	0,700	0,879	0,795	0,776									
IC₅₀ [µg mL⁻¹]									494	731	824	795	561	788	814	524	526±33,3

^a Radna koncentracija ekstrakta

Tabela 8.67. Uticaj ekstrakata *A. oleraceum*, *A. paniculatum* i *A. rhodopeum* na rast ćelija epitelnog karcinoma cerviksa (HeLa)

HeLa	Absorbancija (A)								Procenat od kontole (K) [%]								srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆	K ₇	K ₈	
C [µg mL⁻¹]^a																	
									<i>A. oleraceum</i> , Kosmovac, cela biljka								
62,5	0,749	0,785	0,699	0,771	0,831	0,791	0,724	0,760	89,1	93,4	83,2	91,8	98,9	94,1	86,2	90,4	92,0
125	0,853	0,742	0,818	0,861	0,891	0,805	0,778	0,759	101	88,3	97,4	102	106	95,8	92,6	90,3	96,7
250	0,858	0,762	0,752	0,843	0,825	0,803	0,812	0,735	102	90,7	89,5	100	98,2	95,6	96,6	87,5	95,9
500	0,152	0,175	0,528	0,407	0,320	0,209	0,146	0,131	18,1	20,8	62,8	48,4	38,1	24,9	17,4	15,6	26,2
1000	0,034	0,032	0,033	0,035	0,037	0,029	0,030	0,037	4,05	3,81	3,93	4,17	4,40	3,45	3,57	4,40	3,98
kontrola	0,850	0,766	0,835	0,808	0,886	0,975	0,821	0,781									
									IC₅₀ [µg mL⁻¹]								
									479	445	527	499	467	485	478	403	473±36,9
C [µg mL⁻¹]^a																	
									<i>A. paniculatum</i> , Titelski breg, cela biljka								
62,5	0,710	0,858	0,797	0,745	0,785	0,824	0,819	0,661	84,0	101	94,2	88,1	92,8	97,4	96,9	78,2	93,7
125	0,603	0,685	0,536	0,594	0,804	0,620	0,506	0,371	71,3	81,0	63,4	70,2	95,1	73,3	59,8	43,9	69,8
250	0,294	0,293	0,257	0,247	0,458	0,173	0,104	0,067	34,8	34,6	30,4	29,2	54,2	20,5	12,3	7,92	27,0
500	0,032	0,034	0,031	0,035	0,032	0,037	0,035	0,037	3,78	4,02	3,67	4,14	3,78	4,38	4,14	4,38	4,02
1000	0,033	0,031	0,029	0,033	0,028	0,037	0,030	0,034	3,90	3,67	3,43	3,90	3,31	4,38	3,55	4,02	3,80
kontrola	0,784	0,906	0,872	0,849	0,835	0,885	0,840	0,794									
									IC₅₀ [µg mL⁻¹]								
									199	205	165	183	251	172	142	114	178±23,3
C [µg mL⁻¹]^a																	
									<i>A. paniculatum</i> , Titelski breg, nadzemni deo								
7,81	2,785	2,343	2,27	2,402	2,199	2,505	2,17	2,681	116	97,6	94,6	100	91,6	104	90,4	112	101
15,6	2,513	2,506	2,519	2,348	2,278	2,522	2,533	2,371	105	104	105	97,9	94,9	105	106	98,8	102
31,3	2,726	2,653	2,512	2,3	2,418	2,347	2,475	2,262	114	111	105	95,9	101	97,8	103	94,3	103
62,5	2,805	2,213	2,341	2,524	2,336	2,237	2,219	2,579	117	92,2	97,6	105	97,4	93,2	92,5	107	100
125	2,598	2,336	2,378	2,539	2,338	2,594	2,605	2,498	108	97,4	99,1	106	97,4	108	109	104	104
kontrola	2,282	2,246	2,28	2,54	2,477	2,272	2,533	2,566									
									IC₅₀ [µg mL⁻¹]								
									/	/	/	/	/	/	/	/	>125
C [µg mL⁻¹]^a																	
									<i>A. rhodopeum</i> , Dimitrovgrad, cela biljka								
62,5	0,845	0,907	0,989	1,049	0,879	0,897	0,878	0,868	67,9	72,9	79,5	84,3	70,7	72,1	70,6	69,8	74,2
125	0,148	0,088	0,138	0,109	0,110	0,114	0,084	0,094	11,9	7,07	11,1	8,76	8,84	9,16	6,75	7,56	9,21
250	0,085	0,070	0,108	0,082	0,084	0,071	0,066	0,067	6,83	5,63	8,68	6,59	6,75	5,71	5,31	5,39	6,65
500	0,067	0,046	0,080	0,059	0,075	0,078	0,062	0,052	5,39	3,70	6,43	4,74	6,03	6,27	4,98	4,18	5,08
1000	0,086	0,074	0,085	0,097	0,082	0,081	0,070	0,067	6,91	5,95	6,83	7,80	6,59	6,51	5,63	5,39	6,58
kontrola	1,171	1,209	1,201	1,342	1,242	1,295	1,258	1,233									
									IC₅₀ [µg mL⁻¹]								
									69,5	68,1	71,0	71,3	68,2	407	87,7	67,9	69,3±1,52
C [µg mL⁻¹]^a																	
									<i>A. rhodopeum</i> , Dimitrovgrad, nadzemni deo								
7,81	2,49	2,824	2,527	2,583	2,362	2,710	2,442	2,734	101	115	103	105	96,0	110	99,2	111	105
15,6	2,627	2,518	2,647	2,612	2,830	2,391	2,407	2,610	107	102	107	106	115	97,2	97,8	106	105
31,3	2,803	2,95	2,475	2,755	2,405	2,715	2,352	2,576	114	120	100	112	97,7	110	95,6	105	107
62,5	2,714	2,496	2,375	2,488	2,424	2,471	2,551	2,428	110	101	96,5	101	98,5	100	104	98,7	101
125	2,290	2,366	2,340	2,639	2,226	2,304	2,456	1,508	93,1	96,2	95,1	107	90,5	93,6	99,8	61,3	92,1
kontrola	2,486	2,599	2,448	2,664	2,390	2,468	2,365	2,264									
									IC₅₀ [µg mL⁻¹]								
									/	/	/	/	/	/	/	/	>125

^a Radna koncentracija ekstrakta

Tabela 8.68. Uticaj ekstrakata *A. cepa*, *A. sativum* i standardnih fenolnih jedinjenja na rast ćelija epitelnog karcinoma cerviksa (HeLa)

HeLa	Absorbancija (A)								Procenat od kontole (K) [%]								srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆	K ₇	K ₈	
C [µg mL⁻¹]^a																	
<i>A. cepa</i> , Neradin, cela biljka																	
62,5	0,833	0,839	0,702	0,887	0,843	0,705	0,795	0,849	111	112	93,8	118	113	94,2	106	113	108
125	0,867	0,740	0,869	0,771	0,766	0,759	0,868	0,841	115,8	98,8	116,1	103,0	102	101	116	112	108
250	0,789	0,833	0,768	0,775	0,845	0,682	0,785	0,817	105	111	103	103	113	91,1	105	109	105
500	0,597	0,683	0,738	0,808	0,858	0,741	0,667	0,710	79,7	91,2	98,6	107,9	114,6	99,0	89,1	94,8	92,1
1000	0,211	0,186	0,178	0,266	0,242	0,191	0,198	0,275	28,2	24,8	23,8	35,5	32,3	25,5	26,4	36,7	29,2
kontrola	0,766	0,731	0,807	0,718	0,748	0,809	0,739	0,672									
IC₅₀ [µg mL⁻¹]									699	534	705	670	730	628	763	879	699±46,8
C [µg mL⁻¹]^a																	
<i>A. sativum</i> , Šajkaš, cela biljka																	
62,5	0,756	0,677	0,886	0,800	0,770	0,772	0,718	0,907	101	90,4	118	107	103	103	95,9	121	105
125	0,702	0,750	0,749	0,838	0,784	0,785	0,822	0,821	93,8	100	100	112	105	105	110	110	104
250	0,756	0,787	0,789	0,790	0,798	0,799	0,847	0,835	101	105	105	105	107	107	113	111	107
500	0,784	0,844	0,871	0,839	0,724	0,715	0,787	0,734	105	113	116	112	96,7	95,5	105	98,0	105
1000	0,396	0,472	0,451	0,476	0,446	0,491	0,401	0,473	52,9	63,0	60,2	63,6	59,6	65,6	53,6	63,2	60,2
kontrola	0,766	0,731	0,807	0,718	0,748	0,809	0,739	0,672									
IC₅₀ [µg mL⁻¹]									/	/	/	/	/	/	/	/	>1000
C [µg mL⁻¹]^a																	
<i>ferulna kiselina</i>																	
31,2	0,981	0,908	0,998	0,908	0,860	0,915	0,930	0,816	102	94,7	104	94,7	89,7	95,4	97,0	85,1	95,2
62,5	0,852	0,762	0,926	0,763	0,795	0,898	0,850	0,804	88,9	79,5	96,6	79,6	83,0	93,6	88,7	83,9	87,0
125	/	0,342	0,505	0,434	0,964	0,523	0,264	0,506	/	35,7	52,7	45,3	101	54,6	27,5	52,8	44,8
250	/	0,361	0,235	0,190	0,196	0,177	0,201	0,209	/	37,7	24,5	19,8	20,4	18,5	21,0	21,9	23,9
500	0,165	0,154	0,159	0,136	0,146	0,153	0,152	0,158	17,2	16,1	16,6	14,2	15,3	16,0	15,8	16,5	15,9
kontrola	0,985	0,946	0,966	0,937	1,148	0,983	0,773	0,930									
IC₅₀ [µg mL⁻¹]									262	98,2	129	116	160	129	100	128	117±14,6
C [µg mL⁻¹]^a																	
<i>kvercetin</i>																	
7,81	0,277	0,451	0,367	0,482	0,350	0,352	0,404	0,387	48,1	78,2	63,7	83,6	60,7	61,1	70,1	67,1	69,2
15,6	0,507	0,207	0,198	0,195	0,225	0,219	0,162	0,184	88,0	35,9	34,4	33,8	39,0	38,0	28,1	31,9	34,5
31,3	0,608	0,071	0,056	0,076	0,062	0,070	0,066	0,078	105,5	12,3	9,72	13,2	10,8	12,1	11,5	13,5	11,9
62,5	0,749	0,087	0,090	0,102	0,055	0,062	0,082	0,079	130,0	15,1	15,6	17,7	9,54	10,8	14,2	13,7	13,8
kontrola	0,615	0,709	0,697	0,609	0,707	0,243	0,616	0,415									
IC₅₀ [µg mL⁻¹]									/	12,5	9,88	12,9	11,5	10,9	10,2	10,2	11,2±1,21

^a Radna koncentracija ekstrakta

Tabela 8.69. Uticaj ekstrakata *A. flavum*, *A. melanatherum* i *A. carinatum* subsp. *carinatum* na rast ćelija epitelnog adenokarcinoma dojke (MCF7)

MCF7	Absorbancija (A)								Procenat od kontole (K) [%]								srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆	K ₇	K ₈	
C [µg mL⁻¹]^a																	
<i>A. flavum</i> , Babušnica, cela biljka																	
62,5	0,365	0,393	0,544	0,592	0,502	0,519	0,357	0,329	41,9	45,1	62,5	68,0	57,6	59,6	41,0	37,8	61,9
125	0,060	0,043	0,161	0,160	0,083	0,073	0,066	0,066	6,89	4,94	18,49	18,37	9,53	8,38	7,58	7,58	13,7
250	0,064	0,049	0,061	0,056	0,055	0,068	0,057	0,050	7,35	5,63	7,01	6,43	6,32	7,81	6,55	5,74	6,89
500	0,050	0,053	0,073	0,058	0,070	0,068	0,059	0,065	5,74	6,09	8,38	6,66	8,04	7,81	6,78	7,46	7,72
1000	0,067	0,062	0,073	0,071	0,076	0,073	0,068	0,074	7,69	7,12	8,38	8,15	8,73	8,38	7,81	8,50	8,41
kontrola	0,849	0,885	0,878	0,823	0,893	0,852	0,920	0,866									
IC₅₀ [µg mL⁻¹] / / 112 113 101 92,6 / / 104±9,53																	
<i>A. flavum</i> , Babušnica, nadzemni deo																	
3,91	0,557	0,532	0,572	0,543	0,587	0,559	0,584	0,572	94,8	90,5	97,3	92,4	99,9	95,1	99,4	97,3	95,9
7,81	0,594	0,566	0,56	0,543	0,602	0,549	0,609	0,551	101	96,3	95,3	92,4	102	93,4	104	93,8	97,3
15,6	0,543	0,589	0,565	0,546	0,56	0,573	0,534	0,554	92,4	100	96,1	92,9	95,3	97,5	90,9	94,3	95,0
31,2	0,091	0,12	0,113	0,135	0,194	0,095	0,048	0,027	15,5	20,4	19,2	23,0	33,0	16,2	8,17	4,59	17,5
62,5	0,026	0,046	0,026	0,03	0,04	/	0,047	0,027	4,42	7,83	4,42	5,11	6,8	/	8,00	4,59	5,88
kontrola	0,572	0,59	0,58	0,613	0,615	0,585	0,58	0,566									
IC₅₀ [µg mL⁻¹] 24,9 30,0 27,9 30,2 27,9 24,3 16,7 21,6 25,4±4,59																	
<i>A. melanatherum</i> , Plana, cela biljka																	
62,5	0,895	0,827	0,84	0,854	0,877	0,852	0,790	0,834	103	95,0	96,5	98,1	101	97,8	90,7	95,8	96,1
125	0,513	0,728	0,639	0,840	0,909	0,813	0,725	0,810	58,9	83,6	73,4	96,5	104	93,4	83,3	93,0	92,2
250	0,141	0,203	0,679	0,503	0,504	0,668	0,359	0,253	16,2	23,3	78,0	57,8	57,9	76,7	41,2	29,1	41,8
500	0,066	0,069	0,078	0,113	0,140	0,144	0,076	0,079	7,58	7,92	8,96	13,0	16,1	16,5	8,73	9,07	11,0
1000	0,119	0,095	0,108	0,116	0,107	0,088	0,109	0,112	13,7	10,9	12,4	13,3	12,3	10,1	12,5	12,9	12,4
kontrola	0,849	0,885	0,878	0,823	0,893	0,852	0,920	0,866									
IC₅₀ [µg mL⁻¹] 139 193 322 262 251 340 228 219 231±27,3																	
<i>A. melanatherum</i> , Plana, nadzemni deo																	
7,81	0,494	0,564	0,533	0,472	0,57	0,578	0,568	0,550	87,8	100	94,7	83,9	101	103	101	97,8	94,3
15,6	0,529	0,505	0,558	0,528	0,558	0,586	0,530	0,522	94,0	89,8	99,2	93,8	99,2	104	94,2	92,8	94,8
31,2	0,496	0,551	0,546	0,532	0,565	0,517	0,523	0,509	88,2	97,9	97,0	94,6	100	91,9	93,0	90,5	94,8
62,5	0,288	0,352	0,405	0,411	0,429	0,383	0,385	0,353	51,2	62,6	72,0	73,1	76,2	68,1	68,4	62,7	66,3
125	0,093	0,233	0,100	0,201	0,127	0,226	0,171	0,161	16,5	41,4	17,8	35,7	22,6	40,2	30,4	28,6	27,1
kontrola	0,498	0,577	0,596	0,546	0,552	0,593	0,584	0,555									
IC₅₀ [µg mL⁻¹] 63,0 64,7 65,0 65,7 65,4 89,1 82,3 74,3 66,4±4,01																	
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i> , Čemernik, cela biljka																	
62,5	0,868	0,755	0,809	0,810	0,786	0,798	0,766	0,812	102	88,9	95,3	95,4	92,6	94,0	90,2	95,6	94,1
125	0,867	0,727	0,759	0,715	0,719	0,813	0,813	0,822	102	85,6	89,4	84,2	84,7	95,7	95,7	96,8	91,1
250	0,550	0,601	0,640	0,699	0,604	0,714	0,636	0,314	64,8	70,8	75,4	82,3	71,1	84,1	74,9	37,0	74,8
500	0,245	0,213	0,280	0,210	0,283	0,147	0,193	0,166	28,9	25,1	33,0	24,7	33,3	17,3	22,7	19,5	26,4
1000	0,077	0,068	0,104	0,071	0,095	0,085	0,082	0,071	9,07	8,01	12,2	8,36	11,2	10,0	9,66	8,36	9,79
kontrola	0,841	0,801	0,865	0,807	0,851	0,893	0,823	0,912									
IC₅₀ [µg mL⁻¹] 342 359 393 395 381 367 362 245 371±19,3																	

^a Radna koncentracija ekstrakta

Tabela 8.70. Uticaj ekstrakata *A. carinatum* subsp. *pulchelum*, *A. fuscum* i *A. pallens* na rast ćelija epitelnog adenokarcinoma dojke (MCF7)

MCF7	Absorbancija (A)								Procenat od kontole (K) [%]								srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆	K ₇	K ₈	
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchelum</i>, Vlasinsko jezero, cela biljka																	
C [$\mu\text{g mL}^{-1}$] ^a																	
62,5	0,698	0,749	0,692	0,663	0,725	0,724	0,774	0,576	105	113	104	99,6	109	109	116	86,6	104
125	0,705	0,616	0,567	0,524	0,659	0,736	0,623	0,574	106	92,6	85,2	78,8	99,0	111	93,6	86,3	91,4
250	0,517	0,271	0,502	0,464	0,542	0,591	0,337	0,231	77,7	40,7	75,4	69,7	81,5	88,8	50,6	34,7	54,7
500	0,045	0,074	0,082	0,046	0,155	0,297	0,050	0,062	6,76	11,1	12,3	6,91	23,3	44,6	7,51	9,32	8,33
1000	0,030	0,037	0,033	0,033	0,041	0,039	0,041	0,033	4,51	5,56	4,96	4,96	6,16	5,86	6,16	4,96	5,23
kontrola	0,719	0,724	0,766	0,724	0,729	0,760	0,783	0,118									
	IC ₅₀ [$\mu\text{g mL}^{-1}$]								259	226	331	307	371	468	248	234	255±31,9
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchelum</i>, Vlasinsko jezero, nadzemni deo																	
C [$\mu\text{g mL}^{-1}$] ^a																	
7,81	0,562	0,571	0,611	0,591	0,530	0,587	0,567	0,565	99,8	101	109	105	94,1	104	101	100	102
15,6	0,541	0,572	0,570	0,515	0,561	0,564	0,59	0,593	96,1	102	101	91,5	99,6	100	105	105	100
31,2	0,544	0,535	0,576	0,567	0,600	0,587	0,543	0,537	96,6	95,0	102	101	107	104	96,4	95,4	99,6
62,5	0,511	0,506	0,540	0,510	0,540	0,516	0,578	0,550	90,7	89,9	95,9	90,6	95,9	91,6	103	97,7	94,4
125	0,562	0,458	0,507	0,556	0,542	0,498	0,563	0,487	99,8	81,3	90,0	98,7	96,2	88,4	100	86,5	92,6
kontrola	0,544	0,532	0,540	0,564	0,577	0,623	0,598	0,527									
	IC ₅₀ [$\mu\text{g mL}^{-1}$]								/	/	/	/	/	/	/	/	>125
<i>A. fuscum</i> var. <i>fuscum</i>, Zaovine, cela biljka																	
C [$\mu\text{g mL}^{-1}$] ^a																	
62,5	0,837	0,871	0,891	0,914	0,872	0,897	0,916	0,850	98,0	102	104	107	102	105	107	99,5	103
125	0,816	0,781	0,909	0,801	0,817	0,810	0,843	0,768	95,5	91,4	106	93,7	95,6	94,8	98,7	89,9	95,7
250	0,363	0,557	0,397	0,462	0,491	0,475	0,427	0,491	42,5	65,2	46,5	54,1	57,5	55,6	50,0	57,5	53,6
500	0,038	0,037	0,041	0,043	0,052	0,054	0,055	0,046	4,45	4,33	4,80	5,03	6,09	6,32	6,44	5,38	5,35
1000	0,046	0,037	0,038	0,046	0,053	0,046	0,049	0,049	5,38	4,33	4,45	5,38	6,20	5,38	5,73	5,73	5,32
kontrola	0,807	0,814	0,876	0,869	0,901	0,863	0,867	0,839									
	IC ₅₀ [$\mu\text{g mL}^{-1}$]								239	288	249	259	267	264	250	269	261±14,9
<i>A. fuscum</i> var. <i>fuscum</i>, Zaovine, nadzemni deo																	
C [$\mu\text{g mL}^{-1}$] ^a																	
62,5	0,799	0,79	0,816	0,829	0,881	0,797	0,786	0,777	99,2	98,1	101	103	109	98,9	97,6	96,4	100
125	0,801	0,777	0,812	0,844	0,814	0,801	0,786	0,715	99,4	96,4	101	105	101	99,4	97,6	88,8	98,5
250	0,274	0,393	0,209	0,240	0,397	0,301	0,116	0,094	34,0	48,8	25,9	29,8	49,3	37,4	14,4	11,7	31,4
500	0,030	0,035	0,038	0,038	0,039	0,039	0,051	0,040	3,72	4,34	4,72	4,72	4,84	4,84	6,33	4,97	4,81
1000	0,029	0,032	0,036	0,033	0,038	0,036	0,049	0,039	3,60	3,97	4,47	4,10	4,72	4,47	6,08	4,84	4,53
kontrola	0,748	0,828	0,833	0,882	0,805	0,801	0,770	0,778									
	IC ₅₀ [$\mu\text{g mL}^{-1}$]								246	248	228	244	249	247	239	185	236±21,4
<i>A. pallens</i>, Beli Rzav, cela biljka																	
C [$\mu\text{g mL}^{-1}$] ^a																	
62,5	0,835	0,898	0,884	0,882	0,952	0,920	0,890	0,819	93,9	101	99,4	99,2	107	103	100	92,1	99,0
125	0,810	0,846	0,918	0,906	0,871	0,913	0,947	0,776	91,1	95,2	103	102	98,0	103	107	87,3	96,9
250	0,823	0,878	0,887	0,859	0,856	0,900	0,864	0,849	92,6	98,8	99,8	96,6	96,3	101	97,2	95,5	96,7
500	0,476	0,722	0,611	0,698	0,573	0,699	0,543	0,471	53,5	81,2	68,7	78,5	64,5	78,6	61,1	53,0	63,7
1000	0,040	0,050	0,054	0,049	0,052	0,058	0,061	0,068	4,50	5,62	6,07	5,51	5,85	6,52	6,86	7,65	6,09
kontrola	0,870	0,890	0,907	0,906	0,901	0,868	0,883	0,887									
	IC ₅₀ [$\mu\text{g mL}^{-1}$]								503	526	555	668	589	621	545	502	537±33,7

^a Radna koncentracija ekstrakta

Tabela 8.71. Uticaj ekstrakata *A. oleraceum*, *A. paniculatum* i *A. rhodopeum* na rast ćelija epitelnog adenokarcinoma dojke (MCF7)

MCF7	Absorbancija (A)								Procenat od kontole (K) [%]								srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆	K ₇	K ₈	
C [µg mL⁻¹]^a	<i>A. oleraceum</i>, Kosmovac, cela biljka																
62,5	0,812	0,874	0,866	0,876	0,869	0,918	0,866	0,860	95,0	102	101	103	102	107	101	101	103
125	0,788	0,847	0,859	0,856	0,872	0,856	0,894	0,793	92,2	99,1	101	100	102	100	105	92,8	99,4
250	0,805	0,784	0,796	0,817	0,828	0,864	0,829	0,768	94,2	91,7	93,2	95,6	96,9	101	97,0	89,9	94,6
500	0,096	0,081	0,209	0,303	0,339	0,109	0,093	0,065	11,2	9,48	24,5	35,5	39,7	12,8	10,9	7,61	13,0
1000	0,047	0,051	0,054	0,054	0,060	0,055	0,059	0,058	5,50	5,97	6,32	6,32	7,02	6,44	6,90	6,79	6,48
kontrola	0,807	0,814	0,876	0,869	0,901	0,863	0,867	0,839									
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								466	358	415	452	467	399	374	345	378±28,6
C [µg mL⁻¹]^a	<i>A. paniculatum</i>, Titelski breg, cela biljka																
62,5	0,372	0,569	0,605	0,645	0,616	0,560	0,337	0,367	46,2	70,6	75,1	80,1	76,5	69,5	41,8	63,0	72,5
125	0,239	0,574	0,358	0,627	0,422	0,402	0,452	0,410	29,7	71,2	44,4	77,8	52,4	49,9	56,1	50,9	55,3
250	0,040	0,071	0,057	0,076	0,125	0,042	0,045	0,054	4,97	8,81	7,08	9,43	15,5	5,21	5,59	6,70	8,33
500	0,034	0,035	0,038	0,043	0,048	0,047	0,043	0,043	4,22	4,34	4,72	5,34	5,96	5,83	5,34	5,34	5,27
1000	0,033	0,028	0,027	0,029	0,030	0,035	0,036	0,043	4,10	3,48	3,35	3,60	3,72	4,34	4,47	5,34	4,04
kontrola	0,748	0,828	0,833	0,882	0,805	0,801	0,770	0,778									
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								/	128	115	187	131	125	145	112	135±25,6
C [µg mL⁻¹]^a	<i>A. paniculatum</i>, Titelski breg, nadzemni deo																
7,81	0,531	0,596	0,565	0,565	0,567	0,589	0,619	0,541	90,4	101	96,1	96,1	96,5	100	105	92,1	97,3
15,6	0,553	0,588	0,540	0,582	0,583	0,608	0,624	0,577	94,1	100	91,9	99,0	99,2	103	106	98,2	99,0
31,3	0,575	0,539	0,561	0,587	0,600	0,591	0,566	0,579	97,9	91,7	95,5	99,9	102	101	96,3	98,5	97,8
62,5	0,570	0,612	0,584	0,608	0,604	0,612	0,579	0,529	97,0	104	99,4	103	103	104	98,5	90,0	99,9
125	0,440	0,394	0,421	0,438	0,350	0,531	0,454	0,448	74,9	67,0	71,6	74,5	59,6	90,4	77,3	76,2	73,9
kontrola	0,572	0,590	0,580	0,613	0,615	0,585	0,580	0,566									
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								/	/	/	/	/	/	/	/	>125
C [µg mL⁻¹]^a	<i>A. rhodopeum</i>, Dimitrovgrad, cela biljka																
62,5	0,668	0,576	0,517	0,680	0,638	0,784	0,508	0,664	78,7	67,8	60,9	80,1	75,1	92,3	59,8	78,2	71,5
125	0,070	0,056	0,082	0,064	0,085	0,085	0,071	0,062	8,24	6,60	9,66	7,54	10,0	10,0	8,36	7,30	8,24
250	0,063	0,051	0,059	0,059	0,076	0,052	0,054	0,055	7,42	6,01	6,95	6,95	8,95	6,12	6,36	6,48	7,02
500	0,056	0,045	0,058	0,044	0,057	0,044	0,044	0,042	6,60	5,30	6,83	5,18	6,71	5,18	5,18	4,95	5,82
1000	0,060	0,051	0,055	0,045	0,064	0,063	0,054	0,051	7,07	6,01	6,48	5,30	7,54	7,42	6,36	6,01	6,39
kontrola	0,841	0,801	0,865	0,807	0,851	0,893	0,823	0,912									
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								69,1	67,1	66,1	69,1	69,0	406	65,5	68,7	67,8±1,52
C [µg mL⁻¹]^a	<i>A. rhodopeum</i>, Dimitrovgrad, nadzemni deo																
7,81	0,541	0,506	0,581	0,558	0,618	0,593	0,529	0,566	96,1	89,9	103	99,1	110	105	93,9	101	99,7
15,6	0,505	0,562	0,558	0,595	0,530	0,526	0,544	0,584	89,7	99,8	99,1	106	94,1	93,4	96,6	104	97,8
31,3	0,540	0,550	0,591	0,593	0,619	0,605	0,614	0,601	95,9	97,7	105	105	110	107	109	107	105
62,5	0,531	0,599	0,608	0,507	0,521	0,545	0,580	0,618	94,3	106	108	90,0	92,5	96,8	103	110	100
125	0,234	0,080	0,073	0,116	0,064	0,061	0,070	0,042	41,6	14,2	13,0	20,6	11,4	10,8	12,4	7,5	16,4
kontrola	0,544	0,532	0,540	0,564	0,577	0,623	0,598	0,527									
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								83,7	113	115	66,8	66,8	69,6	96,8	114	90,7±21,7

^a Radna koncentracija ekstrakta

Tabela 8.72. Uticaj ekstrakata *A. cepa*, *A. sativum* i standardnih fenolnih jedinjenja na rast ćelija epitelnog adenokarcinoma dojke (MCF7)

MCF7	Absorbancija (A)								Procenat od kontole (K) [%]								srednja vrednost	
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆	K ₇	K ₈		
C [$\mu\text{g mL}^{-1}$]^a	<i>A. cepa</i>, Nedadin, cela biljka																	
62,5	0,800	0,807	0,790	0,835	0,856	0,859	0,849	0,848	98,8	99,6	97,5	103	106	106	105	105	102	
125	0,806	0,780	0,789	0,865	0,815	0,817	0,830	0,771	99,5	96,3	97,4	107	101	101	102	95,2	99,9	
250	0,769	0,793	0,837	0,872	0,822	0,768	0,809	0,782	94,9	97,9	103	108	101	94,8	99,9	96,5	99,6	
500	0,755	0,756	0,798	0,792	0,788	0,744	0,765	0,730	93,2	93,3	98,5	97,8	97,3	91,9	94,4	90,1	94,6	
1000	0,435	0,456	0,405	0,477	0,475	0,467	0,465	0,425	53,7	56,3	50,0	58,9	58,6	57,7	57,4	52,5	55,6	
kontrola	0,782	0,788	0,824	0,810	0,828	0,851	0,822	0,775										
	IC₅₀ [$\mu\text{g mL}^{-1}$]								/	/	/	/	/	/	/	/	/	>1000
C [$\mu\text{g mL}^{-1}$]^a	<i>A. sativum</i>, Šajkaš, cela biljka																	
62,5	0,791	0,861	0,818	0,829	0,847	0,853	0,866	0,793	97,7	106	101	102	105	105	107	97,9	103	
125	0,786	0,811	0,830	0,840	0,822	0,808	0,844	0,775	97,0	100	102	104	101	99,8	104	95,7	101	
250	0,754	0,781	0,812	0,806	0,799	0,756	0,673	0,669	93,1	96,4	100	99,5	98,6	93,3	83,1	82,6	93,4	
500	0,727	0,749	0,742	0,801	0,746	0,788	0,798	0,764	89,8	92,5	91,6	98,9	92,1	97,3	98,5	94,3	94,4	
1000	0,495	0,397	0,510	0,469	0,508	0,457	0,505	0,546	61,1	49,0	63,0	57,9	62,7	56,4	62,3	67,4	60,0	
kontrola	0,782	0,788	0,824	0,810	0,828	0,851	0,822	0,775										
	IC₅₀ [$\mu\text{g mL}^{-1}$]								/	/	/	/	/	/	/	/	/	>1000
C [$\mu\text{g mL}^{-1}$]^a	ferulna kiselina																	
31,2	0,592	0,59	0,611	0,649	0,625	0,65	0,647	0,724	90,9	90,6	93,9	99,7	96,0	99,8	99,4	111,2	95,9	
62,5	0,516	0,554	0,585	0,548	0,850	0,637	0,625	0,575	79,3	85,1	89,9	84,2	130,6	97,8	96,0	88,3	99,9	
125	/	0,426	0,551	0,554	0,535	0,514	0,570	0,558	0,0	65,4	84,6	85,1	82,2	79,0	87,6	85,7	79,8	
250	/	0,380	0,355	0,423	0,228	0,240	0,271	0,487	0,0	58,4	54,5	65,0	35,0	36,9	41,6	74,8	45,3	
500	/	0,174	0,126	0,132	0,578	0,148	0,193	0,197	0,0	26,7	19,4	20,3	88,8	22,7	29,6	30,3	37,5	
kontrola	0,625	0,597	0,664	0,659	0,880	0,526	0,492	0,765										
	IC₅₀ [$\mu\text{g mL}^{-1}$]								/	280	266	340	191	203	223	383	233±38,9	
C [$\mu\text{g mL}^{-1}$]^a	kvercetin																	
7,81	0,414	0,284	0,502	0,497	0,500	0,511	0,476	/	61,7	42,3	74,8	74,1	74,5	76,1	70,9	/	72,0	
15,6	0,230	0,229	0,238	0,227	0,245	0,261	0,263	0,323	34,3	34,1	35,5	33,8	36,5	38,9	39,2	48,1	36,4	
31,2	0,158	0,094	0,104	0,089	0,089	0,094	0,091	0,076	23,5	14,0	15,5	13,3	13,3	14,0	13,6	11,3	15,5	
62,5	/	/	0,094	0,121	0,090	0,116	0,119	0,116	/	14,9	14,0	18,0	13,4	17,3	17,7	17,3	16,1	
kontrola	0,642	0,684	0,615	0,711	0,660	0,687	0,694	0,676										
	IC₅₀ [$\mu\text{g mL}^{-1}$]								11,6	/	12,1	11,7	12,2	12,8	12,3	/	12,1±0,43	

^a Radna koncentracija ekstrakta

Tabela 8.73. Uticaj ekstrakata *A. flavum*, *A. melantherum* i *A. carinatum* subsp. *carinatum* na rast ćelija adenokarcinoma debelog creva (HT-29)

HT-29	Absorbancija (A)								Procenat od kontole (K) [%]								srednja vrednost	
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆	K ₇	K ₈		
C [µg mL⁻¹]^a	<i>A. flavum</i>, Babušnica, cela biljka																	
62,5	0,368	0,328	0,347	0,285	0,378	0,376	0,428	0,397	72,2	64,3	68,0	55,9	74,1	73,7	83,9	77,8	69,4	
125	0,192	0,166	0,124	0,189	0,217	0,115	0,195	0,223	37,6	32,5	24,3	37,1	42,5	22,5	38,2	43,7	34,3	
250	0,094	0,121	0,066	0,156	0,141	0,087	0,265	0,168	18,4	23,7	12,9	30,6	27,6	17,1	52,0	32,9	23,3	
500	0,043	0,037	0,037	0,099	0,077	0,061	0,069	0,047	8,43	7,25	7,25	19,4	15,1	12,0	13,5	9,22	11,2	
1000	0,037	0,039	0,045	0,102	0,080	0,051	0,071	0,056	7,25	7,65	8,82	20,0	15,7	10,0	13,9	11,0	11,5	
kontrola	0,512	0,524	0,538	0,519	0,548	0,500	0,454	0,485										
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								95,2	82,6	75,9	75,4	104	76,5	433	112	88,8±15,1	
C [µg mL⁻¹]^a	<i>A. flavum</i>, Babušnica, nadzemni deo																	
15,6	1,209	1,158	1,142	1,235	1,238	1,156	1,207	1,156	103	98,4	97,0	105	105	98,2	103	98,2	100	
31,2	1,234	1,224	1,225	1,254	1,275	1,205	1,244	1,171	105	104	104	107	108	102	106	99,5	104	
62,5	1,227	1,197	1,218	1,193	1,221	1,227	1,159	1,197	104	102	103	101	104	104	98,4	102	103	
125	0,853	0,858	1,016	0,726	0,910	0,673	0,904	0,865	72,4	72,9	86,3	61,7	77,3	57,2	76,8	73,5	70,7	
250	0,072	0,079	0,092	0,114	0,139	0,132	0,190	0,161	6,12	6,71	7,81	9,68	11,8	11,2	16,1	13,7	9,20	
kontrola	1,188	1,208	1,22	1,15	1,151	1,182	1,151	1,169										
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								129	129	132	136	453	125	467	129	130±3,62	
C [µg mL⁻¹]^a	<i>A. melantherum</i>, Plana, cela biljka																	
62,5	0,463	/	/	0,596	/	0,517	0,523	0,528	90,8	/	/	117	/	101	103	104	103	
125	0,444	0,386	0,520	0,509	0,455	0,508	0,466	0,443	87,1	75,7	102	99,8	89,2	99,6	91,4	86,9	89,9	
250	0,324	/	/	0,332	0,434	0,471	/	0,383	63,5	/	/	65,1	85,1	92,4	/	75,1	76,2	
500	0,253	0,222	/	0,140	0,248	0,194	0,223	0,231	49,6	43,5	/	27,5	48,6	38,0	43,7	45,3	42,3	
1000	0,065	0,055	0,047	0,076	0,080	0,084	0,078	0,053	12,7	10,8	9,2	14,9	15,7	16,5	15,3	10,4	13,8	
kontrola	0,512	0,524	0,538	0,519	0,548	0,500	0,454	0,485										
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								460	414	636	322	512	436	473	461	440±60,2	
C [µg mL⁻¹]^a	<i>A. melantherum</i>, Plana, nadzemni deo																	
31,2	1,256	1,330	1,400	1,296	1,347	1,356	1,353	1,345	98,2	104	109	101	105	106	106	105	104	
62,5	1,311	1,251	1,372	1,387	1,282	1,301	1,292	1,364	103	97,8	107	108	100	102	101	107	103	
125	1,434	1,304	1,349	1,336	1,451	1,375	1,437	1,443	112	102	105	104	113	108	112	113	109	
250	1,254	1,257	1,414	1,431	1,354	1,350	1,402	1,332	98,0	98,3	111	112	106	106	110	104	105	
500	1,057	1,047	1,138	1,183	1,315	1,268	1,081	1,331	82,6	81,9	89,0	92,5	103	99,1	84,5	104	92,1	
kontrola	1,285	1,277	1,306	1,392	1,302	1,298	1,204	1,168										
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								/	/	/	/	/	/	/	/	/	>500
C [µg mL⁻¹]^a	<i>A. carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i>, Čemernik, cela biljka																	
62,5	0,514	0,572	0,559	0,608	0,597	0,556	0,531	0,553	98,0	109	107	116	114	106	101	105	107	
125	0,474	0,522	0,542	0,610	0,589	0,538	0,546	0,551	90,4	99,6	103	116	112	103	104	105	104	
250	0,462	0,517	0,313	0,564	0,518	0,469	0,551	0,438	88,1	98,6	59,7	108	98,8	89,5	105	83,5	92,5	
500	0,242	0,295	0,366	0,335	0,236	0,288	0,471	0,366	46,2	56,3	69,8	63,9	45,0	54,9	89,8	69,8	60,8	
1000	0,056	0,061	0,059	0,113	0,089	0,066	0,072	0,073	10,7	11,6	11,3	21,6	17,0	12,6	13,7	13,9	14,1	
kontrola	0,540	0,509	0,523	0,560	0,543	0,530	0,473	0,516										
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								478	537	551	587	470	539	548	662	530±41,5	

^a Radna koncentracija ekstrakta

Tabela 8.74. Uticaj ekstrakata *A. carinatum* subsp. *pulchelum*, *A. fuscum* i *A. pallens* na rast ćelija adenokarcinoma debelog creva (HT-29)

HT-29	Absorbancija (A)								Procenat od kontole (K) [%]								srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆	K ₇	K ₈	
C [µg mL⁻¹]^a																	
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchelum</i> , Vlasinsko jezero, cela biljka																	
62,5	1,332	1,285	1,348	1,394	1,412	1,371	1,274	1,310	98,2	94,7	99,4	103	104	101	93,9	96,6	98,8
125	1,352	1,372	1,321	1,370	1,456	1,366	1,305	1,361	99,6	101	97,4	101	107	101	96,2	100	100
250	0,564	0,806	0,518	0,867	0,666	0,570	0,782	0,519	41,6	59,4	38,2	63,9	49,1	42,0	57,6	38,3	48,8
500	0,139	0,174	0,162	0,099	0,111	0,074	0,107	0,107	10,2	12,8	11,9	7,30	8,18	5,45	7,89	7,89	8,96
1000	0,065	0,067	0,093	0,114	0,081	0,083	0,077	0,084	4,79	4,94	6,85	8,40	5,97	6,12	5,68	6,19	6,12
kontrola	1,349	1,295	1,327	1,372	1,387	1,442	1,291	1,391									
IC₅₀ [µg mL⁻¹]									247	253	234	271	250	243	252	247	250±10,4
C [µg mL⁻¹]^a																	
<i>A. carinatum</i> subsp. <i>pulchelum</i> , Vlasinsko jezero, nadzemni deo																	
31,25	1,270	1,309	1,355	1,300	1,307	1,265	1,301	1,358	85,3	87,9	91,0	87,3	87,8	84,9	87,4	91,2	87,8
62,5	1,367	1,307	1,379	1,338	1,313	1,271	1,399	1,243	91,8	87,8	92,6	89,8	88,2	85,3	93,9	83,5	89,1
125	1,365	1,232	1,542	1,345	1,359	1,330	1,286	1,380	91,6	82,7	104	90,3	91,2	89,3	86,3	92,7	91,0
250	1,255	1,270	1,307	1,338	1,360	1,328	1,296	1,380	84,3	85,3	87,8	89,8	91,3	89,2	87,0	92,7	88,4
500	1,162	0,921	1,342	1,336	1,307	1,353	1,176	1,139	78,0	61,8	90,1	89,7	87,8	90,8	79,0	76,5	81,7
kontrola	1,600	1,485	1,531	1,589	1,511	1,342	1,454	1,403									
IC₅₀ [µg mL⁻¹]									/	/	/	/	/	/	/	/	>500
C [µg mL⁻¹]^a																	
<i>A. fuscum</i> var. <i>fuscum</i> , Zaovine, cela biljka																	
62,5	1,145	1,214	1,271	1,319	1,276	1,298	1,232	1,422	88,5	93,8	98,2	102	98,6	100	95,2	110	97,1
125	1,051	1,158	1,139	1,322	1,429	1,377	1,201	1,333	81,2	89,5	88,0	102	110	106	92,8	103	96,8
250	1,299	1,100	1,362	1,295	1,454	1,428	1,374	1,230	100	85,0	105	100	112	110	106	95,0	106
500	0,756	0,980	0,883	1,025	1,206	1,029	0,948	1,251	58,4	75,7	68,2	79,2	93,2	79,5	73,2	96,6	75,3
1000	0,203	0,151	0,148	0,182	0,166	0,193	0,159	0,288	15,7	11,7	11,4	14,1	12,8	14,9	12,3	22,3	13,5
kontrola	1,254	1,305	1,263	1,334	1,308	1,320	1,212	1,359									
IC₅₀ [µg mL⁻¹]									506	772	513	636	533	519	516	896	537±49,2
C [µg mL⁻¹]^a																	
<i>A. fuscum</i> var. <i>fuscum</i> , Zaovine, nadzemni deo																	
62,5	1,327	1,203	1,288	1,304	1,424	1,270	1,340	1,281	106	96,2	103	104	114	102	107	102	104
125	1,318	1,215	1,295	1,381	1,381	1,191	1,278	1,309	105	97,2	104	110	110	95,3	102	105	103
250	1,329	1,297	1,386	1,367	1,395	1,370	1,327	1,342	106	104	111	109	112	110	106	107	108
500	1,138	1,208	1,232	1,224	1,248	1,257	1,357	1,316	91,0	96,6	98,6	97,9	99,8	100	108	105	100
1000	0,238	0,197	0,162	0,216	0,152	0,151	0,133	0,210	19,0	15,8	13,0	17,3	12,2	12,1	10,6	16,8	14,3
kontrola	1,155	1,204	1,283	1,294	1,359	1,211	1,322	1,173									
IC₅₀ [µg mL⁻¹]									845	790	833	676	742	637	677	759	745±76,6
C [µg mL⁻¹]^a																	
<i>A. pallens</i> , Beli Rzav, cela biljka																	
62,5	1,234	1,193	1,259	1,365	1,254	1,379	1,337	1,314	98,7	95,4	101	109	100	110	107	105	104
125	1,180	1,226	1,243	1,325	1,325	1,245	1,257	1,280	94,4	98,1	99,4	106	106	99,6	101	102	101
250	1,278	1,235	1,199	1,290	1,273	1,278	1,163	1,239	102	98,8	95,9	103	102	102	93,0	99,1	99,5
500	0,864	1,263	1,025	1,129	1,296	1,268	1,186	1,206	69,1	101	82,0	90,3	104	101	94,9	96,5	92,8
1000	0,534	0,527	0,369	0,468	0,561	0,688	0,699	0,519	42,7	42,2	29,5	37,4	44,9	55,0	55,9	41,5	43,4
kontrola	1,155	1,204	1,283	1,294	1,359	1,211	1,322	1,173									
IC₅₀ [µg mL⁻¹]									883	895	841	870	909	/	/	904	884±25,3

^a Radna koncentracija ekstrakta

Tabela 8.75. Uticaj ekstrakata *A. oleraceum*, *A. paniculatum* i *A. rhodopeum* na rast ćelija adenokarcinoma debelog creva (HT-29)

HT-29	Absorbancija (A)								Procenat od kontole (K) [%]								srednja vrednost
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆	K ₇	K ₈	
C [µg mL⁻¹]^a	<i>A. oleraceum</i> , Kosmovac, cela biljka																
62,5	1,160	1,276	1,283	1,400	1,400	1,266	1,296	1,357	89,6	98,6	99,1	108	108	97,8	100	105	103
125	1,180	1,116	1,329	1,261	1,245	1,221	1,206	1,304	91,2	86,2	103	97,4	96,2	94,3	93,2	101	97,4
250	1,235	1,209	1,251	1,209	1,365	1,285	1,320	1,315	95,4	93,4	96,6	93,4	105	99,3	102	102	99,7
500	0,966	1,075	1,057	1,193	1,084	1,341	1,145	1,287	74,6	83,1	81,7	92,2	83,7	104	88,5	99,4	91,5
1000	0,353	0,126	0,122	0,195	0,163	0,127	0,137	0,144	27,3	9,73	9,43	15,1	12,6	9,81	10,6	11,1	11,4
kontrola	1,254	1,305	1,263	1,334	1,308	1,320	1,212	1,359									
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								778	513	659	599	586	665	602	684	633±41,5
C [µg mL⁻¹]^a	<i>A. paniculatum</i> , Titelski breg, cela biljka																
62,5	1,403	1,322	1,487	1,433	1,449	1,481	1,348	1,479	103	97,4	110	106	107	109	99,4	109	105
125	0,323	0,258	0,282	0,277	0,294	0,144	0,291	0,321	23,8	19,0	20,8	20,4	21,7	10,6	21,4	23,7	20,2
250	0,187	0,062	0,065	0,173	0,173	0,188	0,115	0,177	13,8	4,57	4,79	12,8	12,8	13,9	8,48	13,0	10,5
500	0,069	0,067	0,056	0,187	0,110	0,074	0,055	0,063	5,09	4,94	4,13	13,78	8,11	5,45	4,05	4,64	6,27
1000	0,076	0,086	0,086	0,191	0,131	0,102	0,105	0,117	5,60	6,34	6,34	14,08	9,66	7,52	7,74	8,62	8,24
kontrola	1,349	1,295	1,327	1,372	1,387	1,442	1,291	1,391									
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								91,6	111	114	110	88,8	76,9	88,6	92,0	96,7±13,4
C [µg mL⁻¹]^a	<i>A. paniculatum</i> , Titelski breg, nadzemni deo																
31,2	1,162	1,218	1,260	1,376	1,358	1,243	1,330	1,295	90,9	95,2	98,5	108	106	97,2	104	101	100,1
62,5	1,263	1,318	1,329	1,349	1,365	1,363	1,307	1,275	98,7	103	104	105	107	107	102	100	103,3
125	1,219	1,341	1,267	1,387	1,294	1,242	1,233	1,357	95,3	105	99,1	108	101	97,1	96,4	106	101,1
250	1,303	1,364	1,270	1,346	1,341	1,325	1,311	1,253	102	107	99,3	105	105	104	103	98,0	102,7
500	1,426	1,263	1,378	1,353	1,388	1,314	1,298	1,339	111	98,7	108	106	109	103	101	105	105,2
kontrola	1,285	1,277	1,306	1,392	1,302	1,298	1,204	1,168									
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								/	/	/	/	/	/	/	/	>500
C [µg mL⁻¹]^a	<i>A. rhodopeum</i> , Dimitrovgrad, cela biljka																
62,5	0,497	0,537	0,508	0,556	0,543	0,543	0,533	0,456	94,8	102	96,9	106	104	104	102	87,0	99,5
125	0,144	0,110	0,119	0,135	0,127	0,110	0,140	0,128	27,5	21,0	22,7	25,8	24,2	21,0	26,7	24,4	24,2
250	0,041	0,035	0,042	0,076	0,052	0,042	0,042	0,042	7,82	6,68	8,01	14,50	9,92	8,01	8,01	8,01	8,87
500	0,030	0,032	0,027	0,062	0,042	0,036	0,039	0,037	5,72	6,10	5,15	11,83	8,01	6,87	7,44	7,06	7,27
1000	0,037	0,036	0,047	0,067	0,068	0,058	0,063	0,053	7,06	6,87	8,97	12,78	12,97	11,06	12,02	10,11	10,2
kontrola	0,540	0,509	0,523	0,560	0,543	0,530	0,473	0,516									
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								98,1	99,4	93,4	86,8	117	116	119	117	106±12,6
C [µg mL⁻¹]^a	<i>A. rhodopeum</i> , Dimitrovgrad, nadzemni deo																
31,2	1,376	1,358	1,306	1,424	1,307	1,322	1,269	1,313	92,4	91,2	87,7	95,6	87,8	88,8	85,2	88,2	89,6
62,5	1,297	1,346	1,329	1,316	1,319	1,285	1,282	1,180	87,1	90,4	89,2	88,4	88,6	86,3	86,1	79,2	86,9
125	1,274	1,366	1,250	1,333	1,372	1,425	1,383	1,419	85,5	91,7	83,9	89,5	92,1	95,7	92,9	95,3	90,8
250	1,266	1,169	1,328	1,365	1,284	1,272	1,138	1,303	85,0	78,5	89,2	91,6	86,2	85,4	76,4	87,5	85,0
500	0,409	0,350	0,816	1,387	1,090	1,116	1,097	0,802	27,5	23,5	54,8	93,1	73,2	74,9	73,7	53,8	59,3
kontrola	1,600	1,485	1,531	1,589	1,511	1,342	1,454	1,403									
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								454	403	/	/	/	/	/	/	>250

^a Radna koncentracija ekstrakta

Tabela 8.76. Uticaj ekstrakata *A. cepa*, *A. sativum* i standardnih fenolnih jedinjenja na rast ćelija adenokarcinoma debelog creva (HT-29)

HT-29	Absorbancija (A)								Procenat od kontole (K) [%]								srednja vrednost	
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆	K ₇	K ₈		
C [µg mL⁻¹]^a	<i>A. cepa</i>, Nedadin, cela biljka																	
62,5	1,193	1,228	1,211	1,259	1,382	1,330	1,242	1,304	101	104	103	107	117	113	105	111	108	
125	1,253	1,137	1,099	1,271	1,284	1,275	1,187	1,317	106	96,5	93,3	108	109	108	101	112	104	
250	1,233	1,222	1,164	1,404	1,318	1,324	1,244	1,317	105	104	98,8	119	112	112	106	112	109	
500	1,271	1,263	1,347	1,613	1,417	1,355	1,343	1,285	108	107	114	137	120	115	114	109	116	
1000	1,198	1,189	1,248	1,334	1,362	1,270	1,198	1,209	102	101	106	113	116	108	102	103	106	
kontrola	1,171	1,159	1,128	1,122	1,181	1,208	1,298	1,155										
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								/	/	/	/	/	/	/	/	/	>1000
C [µg mL⁻¹]^a	<i>A. sativum</i>, Šajkaš, cela biljka																	
62,5	1,275	1,181	1,169	1,313	1,175	1,253	1,203	1,225	108	100	99,3	111	100	106	102	104	104	
125	1,221	1,285	1,214	1,385	1,184	1,145	1,220	1,256	104	109	103	118	101	97,2	104	107	105	
250	1,319	1,224	1,292	1,473	1,456	1,299	1,225	1,420	112	104	110	125	124	110	104	121	114	
500	1,281	1,209	1,254	1,479	1,320	1,343	1,349	1,307	109	103	106	126	112	114	115	111	112	
1000	1,236	1,126	1,164	1,296	1,304	1,306	1,331	1,302	105	95,6	98,8	110	111	111	113	111	107	
kontrola	1,171	1,159	1,128	1,122	1,181	1,208	1,298	1,155										
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								/	/	/	/	/	/	/	/	/	>1000
C [µg mL⁻¹]^a	ferulna kiselina																	
31,2	0,456	0,483	0,451	0,487	0,510	0,513	0,476	0,483	98,1	104	97,1	105	110	110	102	104	104	
62,5	0,420	0,468	0,495	0,495	0,466	0,497	0,541	0,447	90,4	101	107	107	100	107	116	96,2	103	
125	0,459	0,522	0,406	0,514	0,465	0,566	0,585	0,433	98,8	112	87,4	111	100	122	126	93,2	106	
250	0,389	0,461	0,417	0,416	0,373	0,285	0,523	0,524	83,7	99,2	89,7	89,5	80,3	61,3	113	113	91,1	
500	0,582	0,226	0,505	0,405	0,387	0,354	0,287	0,294	125	48,6	109	87,2	83,3	76,2	61,8	63,3	81,8	
kontrola	0,387	0,494	0,504	0,424	0,372	0,473	0,536	0,527										
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								/	/	/	/	/	/	/	/	/	>500
C [µg mL⁻¹]^a	kvercetin																	
7,81	1,133	1,119	1,029	1,087	1,145	1,064	1,126	1,174	94,1	93,0	85,5	90,3	95,1	88,4	93,5	97,5	91,4	
15,6	1,073	0,963	0,913	1,063	0,990	1,086	1,172	1,166	89,1	80,0	75,8	88,3	82,2	90,2	97,4	96,9	86,2	
31,2	0,614	0,703	0,803	0,825	0,818	0,714	0,815	0,904	51,0	58,4	66,7	68,5	68,0	59,3	67,7	75,1	62,8	
62,5	/	0,394	0,289	0,433	0,397	0,736	0,714	0,613	0,0	32,7	24,0	36,0	33,0	61,1	59,3	50,9	35,2	
125	0,263	0,323	0,295	0,237	0,230	0,233	0,249	0,242	21,8	26,8	24,5	19,7	19,1	19,4	20,7	20,1	21,7	
kontrola	1,216	1,046	1,148	1,054	1,340	1,151	1,288	1,387										
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								33,0	37,9	39,6	47,5	44,5	44,7	53,5	63,8	43,0±6,74	

^a Radna koncentracija ekstrakta

Tabela 8.77. Uticaj standardnog rastvora rutina na rast fetalnih fibroblasta pluća (MRC-5), ćelija epitelnog karcinoma cerviksa (HeLa), epitelnog adenokarcinoma dojke (MCF7) i adenokarcinoma debelog creva (HT-29)

MRC-5	Absorbancija (A)								Procenat od kontole (K) [%]								srednja vrednost	
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆	K ₇	K ₈		
C [µg mL⁻¹]^a	rutin																	
31,2	0,611	0,635	0,637	0,662	0,683	0,615	0,651	0,646	101	105	105	109	113	101	107	107	106	
62,5	0,593	0,584	0,601	0,619	0,645	0,622	0,596	0,582	97,8	96,3	99,1	102	106	103	98,3	96,0	100	
125	0,601	0,590	0,583	0,660	0,648	0,567	0,578	0,534	99,1	97,3	96,2	109	107	93,5	95,3	88,1	98,2	
250	0,589	0,623	0,544	0,617	0,663	0,590	0,721	0,684	97,2	103	89,7	102	109	97,3	119	113	104	
500	0,626	0,574	0,646	0,627	0,730	0,547	0,588	0,582	103	94,7	107	103	120	90,2	97,0	96,0	101	
kontrola	0,584	0,608	0,603	0,629	0,615	0,613	0,578	0,620										
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								/	/	/	/	/	/	/	/	/	>500
Hella																		
C [µg mL⁻¹]^a	rutin																	
31,2	1,031	1,006	1,101	1,017	1,220	0,966	1,072	1,331	105	103	112	104	125	98,6	109	136	112	
62,5	0,995	1,007	1,073	1,094	1,277	1,215	1,270	1,209	102	103	110	112	130	124	130	124	117	
125	0,944	0,955	0,945	1,015	1,316	1,056	1,140	1,011	96,4	97,5	96,5	104	134	108	116	103	101	
250	0,602	0,855	0,981	0,903	1,385	1,180	1,324	0,757	61,5	87,3	100	92,2	141	120	135	77,3	83,7	
500	0,788	0,741	0,744	0,824	1,420	1,401	1,328	0,931	80,5	75,7	76,0	84,1	145	143	136	95,1	82,3	
kontrola	0,990	0,959	0,927	1,041	1,173	1,004	0,790	0,950										
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								/	/	/	/	/	/	/	/	/	>500
MCF7																		
C [µg mL⁻¹]^a	rutin																	
31,2	0,616	0,580	0,609	0,651	0,598	0,602	0,609	0,677	107	101	106	114	104	105	106	118	108	
62,5	0,686	0,536	0,569	0,670	0,604	0,661	0,666	0,635	120	93,5	99,3	117	105	115	116	111	110	
125	0,600	0,616	0,653	0,553	0,542	0,623	0,623	0,616	105	107	114	96,5	94,6	109	109	107	105	
250	/	0,494	0,589	0,615	0,519	0,573	0,542	0,602	/	86,2	103	107	90,6	100	94,5	105	98,0	
500	/	0,598	0,576	0,574	0,468	0,488	0,734	0,583	/	104	100	100	81,6	85,2	128	102	100	
kontrola	0,674	0,489	0,485	0,645	0,758	0,453	0,424	0,659										
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								/	/	/	/	/	/	/	/	/	>500
HT-29																		
C [µg mL⁻¹]^a	rutin																	
31,2	0,531	0,532	0,550	0,555	0,541	0,551	0,548	0,546	101	101	104	105	103	104	104	104	103	
62,5	0,487	0,497	0,512	0,512	0,562	0,552	0,510	0,525	92,3	94,2	97,1	97,1	107	105	96,7	99,5	98,5	
125	0,483	0,474	0,470	0,500	0,530	0,481	0,518	0,491	91,6	89,9	89,1	94,8	100	91,2	98,2	93,1	93,5	
250	0,502	0,493	0,568	0,560	0,539	0,478	0,532	0,506	95,2	93,5	108	106	102	90,6	101	95,9	99,0	
500	0,568	0,499	0,479	0,510	0,540	0,502	0,544	0,521	108	94,6	90,8	96,7	102	95,2	103	98,8	98,6	
kontrola	0,495	0,512	0,529	0,539	0,554	0,537	0,530	0,524										
	IC₅₀ [µg mL⁻¹]								/	/	/	/	/	/	/	/	/	>500

^a Radna koncentracija ekstrakta

Tabela 8.78. Rezultati testa za detekcijo apoptoze i nekroze

Uzorak	A (apoptoza)*	A (nekroza)*	A/N	EF-A	EF-N	AI
MCF7						
negativna kontrola	0,630	1,653	0,38			
<i>A. flavum</i> , cela biljka	0,612	2,026	0,30	0,97	1,23	0,79
<i>A. rhodopeum</i> , cela biljka	0,610	1,891	0,32	0,97	1,14	0,85
MCF7						
negativna kontrola	0,203	0,076	2,66			
<i>A. rhodopeum</i> , nadzemni delovi	0,177	0,047	3,80	0,87	0,61	1,42
<i>A. melanatherum</i> , nadzemni delovi	0,498	0,044	11,31	2,46	0,58	4,24
<i>A. flavum</i> , nadzemni delovi	0,201	0,039	5,14	0,99	0,51	1,93
MRC-5						
negativna kontrola	0,094	0,677	0,14			
<i>A. flavum</i> , nadzemni delovi	1,396	0,916	1,52	14,8	1,35	11,0
<i>A. rhodopeum</i> , nadzemni delovi	0,392	0,566	0,69	4,17	0,84	4,99
<i>A. flavum</i> , cela biljka	2,230	1,238	1,80	23,7	1,83	13,0
HeLa						
negativna kontrola	0,311	1,123	0,28			
<i>A. flavum</i> , nadzemni delovi	0,784	1,256	0,62	2,52	1,12	2,25
<i>A. flavum</i> , cela biljka	0,749	1,189	0,63	2,41	1,06	2,27
<i>A. rhodopeum</i> , cela biljka	0,444	1,169	0,38	1,43	1,04	1,37
HT-29						
negativna kontrola	0,188	0,182	1,03			
<i>A. rhodopeum</i> , cela biljka	2,286	0,710	3,22	12,2	3,90	3,12
HT-29						
negativna kontrola	0,193	0,376	0,51			
<i>A. flavum</i> , cela biljka	2,280	3,126	0,73	11,8	8,32	1,42
<i>A. paniculatum</i> , cela biljka	4,192	3,725	1,13	21,7	9,92	2,19

A = $A_{sr} - A_{sp}$; A_{sr} – srednja vrednost absorbance za dva ponavljanja, A_{sp} – absorbance slepe probe

A/N = A(apoptoza)/A(nekroza); EF-A – faktor porasta apoptoze; EF-N – faktor porasta nekroze; AI – porast apoptoze u odnosu na porast nekroze

KRATKA BIOGRAFIJA

Nataša Simin je rođena u Novom Sadu, 24.11.1975. godine. Osnovnu školu završila je u Šajkašu, a gimnaziju «Svetozar Marković» u Novom Sadu. Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu, odsek diplomirani hemičar, upisala je 1994. godine, a diplomirala 2000. godine sa prosečnom ocenom 8.96. Magistraske studije iz Biohemije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu upisala je 2001. godine, a 2003. godine izabrana je u zvanje istraživača-pripravnika za užu naučnu oblast Biohemija. 2004. godine izabrana je u zvanje asistenta-pripravnika za užu naučnu oblast Biohemija. Magistrarsku tezu pod nazivom "Biohemijska ispitivanja antioksidantnih aktivnosti u odabranim vrstama roda *Equisetum* L." odbranila je 2009. godine, a 2010. godine izabrana je u zvanje asistenta za užu naučnu oblast Biohemija.



Počev od 2001. godine, kontinuirano je bila angažovana na Katedri za biohemiju i hemiju prirodnih proizvoda, Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine PMF-a u Novom Sadu u izvođenju praktične nastave za studente hemije i studente biologije.

Dosadašnji naučno-istraživački rad Nataše Simin je prvenstveno iz oblasti biohemije lekovitog bilja i do sada je bila učesnik na jednom međunarodnom projektu IPA prekogranične saradnje sa Mađarskom, dva naučno-istraživačka projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije i dva projekta Pokrajinskog sekretarijata za nauku i tehnološki razvoj. Koautor je šesnaest radova objavljenih u međunarodnim časopisima (pet M21, četiri M22 i deset M23 kategorije) sa indeksom citiranosti od 464. Pored toga, koautor je jednog poglavlja u monografiji međunarodnog značaja i velikog broja saopštenja na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu. Aktivno govori engleski i ruski jezik.

Član je Society of Medicinal Plant Research (GA), Srpskog hemijskog društva i Biohemijskog društva Vojvodine.

Nataša Simin, rođ. Gavarić

Novi Sad, 25.08.2014. godine

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:

RBR

Identifikacioni broj:

IBR

Tip dokumentacije:

Monografska dokumentacija

TD

Tip zapisa:

Tekstualni štampani materijal

TZ

Vrsta rada:

Doktorska disertacija

VR

Autor:

mr Nataša Simin

AU

Mentor:

dr Neda Mimica-Dukić, redovni profesor PMF-a u Novom Sadu

MN

Naslov rada:

Sekundarni biomolekuli u vrstama *Allium* sect. *Codonoprasum* Rchb. – biološke aktivnosti, fitohemijski i hemotaksonomski aspekti

NR

Jezik publikacije:

Srpski

JP

Jezik izvoda:

Srpski/engleski

JI

Zemlja publikovanja:

Srbija

ZP

Uže geog. područje:

Vojvodina

UGP

Godina:

2014.

GO

Izdavač:

Autorski reprint

IZ

Mesto i adresa:

Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3.

MA

Fizički opis rada:

Broj poglavlja: 8. Strana: 333. Lit. citata: 494. Tabela: 109. Slika: 134. Grafika: 95. Priloga:1.

FO

Naučna oblast:

Hemija

NO

Naučna disciplina:

Biohemija

ND

Predmetna odrednica/ključne reči:

Allium, *Codonoprasum*, *Allium carinatum*, *Allium fuscum*, *Allium flavum*, *Allium melanantherum*, *Allium paniculatum*, *Allium pallens*, *Allium rhodopeum*, *Allium oleraceum*, biljni

PO

fenoli, flavonoidi, antioksidansi, antimikrobna aktivnost, antiinflamatorna aktivnost, antimutagena aktivnost, citotoksičnost, genotoksičnost, apoptoza

UDK

Čuva se:

ČU

Važna napomena:

VN

Izvod:

IZ

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitan je hemijski sastav i biološke aktivnosti ekstraktata deset samoniklih taksona roda *Allium* sect. *Codonoprasum*: *A. carinatum* subsp. *pulchellum*, *A. carinatum* subsp. *carinatum*, *A. fuscum* var. *gracile*, *A. fuscum* var. *fuscum*, *A. flavum* subsp. *flavum*, *A. melanantherum*, *A. paniculatum* subsp. *marginatum*, *A. pallens* subsp. *tenuiflorum*, *A. oleraceum* i *A. rhodopeum*, sakupljenih na 27 lokaliteta u Srbiji. Cilj rada bio je da se dobiju podaci o sadržaju biološki aktivnih jedinjenja u ovim, do sada veoma malo ispitanim vrstama roda *Allium*, i utvrdi njihova potencijalna lekovita vrednost.

Analiza hemijskog sastava obuhvatila je: analizu volatilnih komponenti svežih lukovica primenom headspace GC-MS tehnike, kvalitativnu analizu metanolnih ekstraktata primenom tečnohromatografskih metoda (LC-DAD-MS i LC-MS-MS), kvantitativnu analizu odabranih fenolnih jedinjenja LC-MS-MS tehnikom, određivanje sadržaja ukupnih monomernih antocijana i određivanje aktivnosti aliinaze. Ispitivanja bioloških aktivnosti ekstraktata obuhvatila su: određivanje antioksidantne, antiinflamatorne, antimikrobne, antimutagene i genotoksične aktivnosti, kao i ispitivanje uticaja na rast zdravih i tumorskih ćelija i sposobnosti indukcije ćelijske smrti.

Sumiranjem dobijenih rezultata može se zaključiti da ispitivani predstavnici roda *Allium* sect. *Codonoprasum* predstavljaju bogate izvore biološki aktivnih jedinjenja sa širokim spektrom bioloških aktivnosti. Sa hemotaksonomskog aspekta značajno je da se dimetil-disulfid izdvaja kao najdominantnija i često jedina isparljiva komponenta, da ekstrakti većine vrsta sadrže veliku količinu flavonoida (prvenstveno derivata kvercetina), da se vrste *A. pallens* i *A. oleraceum* izdvajaju od ostalih po tome što ne sadrže rutin a sadrže hiperozid, da je vrsta *A. rhodopeum* siromašna fenolnim jedinjenjima i da su sve vrste, osim vrste *A. flavum*, bogate antocijanima. Aktivnost aliinaze je visoka u svim ispitivanim vrstama. Većina ispitivanih ekstraktata, izuzev ekstraktata vrsta *A. carinatum* i *A. melanantherum*, pokazala je izraženu antioksidantnu aktivnost, dok su ekstrakti vrsta *A. flavum*, *A. rhodopeum*, *A. oleraceum* i *A. paniculatum* snažni antiinflamatorni agensi. Ekstrakti ispitivanih predstavnika sect. *Codonoprasum* nisu pokazali antimikrobnu i antimutagenu aktivnost. Takođe, ovi ekstrakti nisu ispoljili genotoksični efekat na ćelije zdravog tkiva (izuzev slabog genotoksičnog efekta ekstrakta nadzemnih delova *A. flavum*), što ukazuje na bezbednost upotrebe vrsta sect. *Codonoprasum* kao hrane ili u obliku lekova. Ekstrakti celih biljaka *A. paniculatum* i *A. rhodopeum*, kao i ekstrakt nadzemnih delova *A. melanantherum* pokazali su snažnu antiproliferativnu aktivnost sa povoljnim ne-tumor/tumor koeficijentima i indukovali apoptozu u tumorskim ćelijama, iz čega se može zaključiti da imaju visok potencijal primene u antitumorskoj terapiji.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća:

DP

Datum odbrane: 2014

DO

Članovi komisije:

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

KO

Predsednik:

dr Mirjana Popsavin, red. prof. PMF-a u Novom Sadu

Mentor:

dr Neda Mimica-Dukić, red. prof. PMF-a u Novom Sadu

Član:

dr Goran Anačkov, docent PMF-a u Novom Sadu

Član:

dr Biljana Božin, vanredni profesor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu

Član:

dr Dragana Četojević-Simin, naučni saradnik Instituta za onkologiju Vojvodine, Medicinski fakultet u Novom Sadu

Član:

dr Dragana Mitić-Ćulafić, naučni saradnik Biološkog fakulteta u Beogradu

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES
KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number:
ANO

Identification number:
INO

Document type: Monograph type
DT

Type of record: Printed text
TR

Contents code: PhD Thesis
CC

Author: Nataša Simin, MSc.
AU

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

Title: Secondary metabolites from selected species of genus *Allium* sect. *Codonoprasum* Rchb. – biological activities, phytochemical and chemotaxonomic aspects
TI

Language of text: Serbian
LT

Language of abstract: Serbian/English
LA

Country of publication: Serbia
CP

Locality of publication: Vojvodina
LP

Publication year: 2014
PY

Publisher: Author's reprint
PU

Publishing place: Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3
PP

Physical description: Chapters: 8. Pages: 333. References: 494. Tables:109. Figures: 134. Graphs: 95. Additional lists: 1.
PD

Scientific field: Chemistry
SF

Scientific discipline: Biochemistry
SD

Subject/Key words: *Allium*, *Codonoprasum*, *Allium carinatum*, *Allium fuscum*, *Allium flavum*, *Allium melanantherum*, *Allium paniculatum*, *Allium pallens*, *Allium rhodopeum*, *Allium oleraceum*, plant phenolics, flavonoids, antioxidants, antimicrobial activity,
UC

anti-inflammatory activity, antimutagenic activity, antiproliferative activity, genotoxicity, apoptosis

Holding data:

HD

Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection (Library), University of Novi Sad Faculty of Sciences, Trg Dositeja Obradovića 3, Novi Sad

Note:

N

Abstract:

AB

In the present doctoral thesis the chemical composition and biological activities of 10 wild growing taxa of genus *Allium* sect. *Codonoprasum* (*A. carinatum* subsp. *pulchellum*, *A. carinatum* subsp. *carinatum*, *A. fuscum* var. *gracile*, *A. fuscum* var. *fuscum*, *A. flavum* subsp. *flavum*, *A. melanantherum*, *A. oleraceum*, *A. paniculatum* subsp. *marginatum*, *A. pallens* subsp. *tenuiflorum* and *A. rhodopeum*) were investigated. The samples were collected from 27 locations in Serbia. The aim of the study was to obtain data on the content of biologically active compounds in extracts of these unexplored species of the genus *Allium* and to determine their potential medicinal value.

Phytochemical characterisation included: headspace GC-MS analysis of fresh bulb volatiles, LC-DAD-MS and LC-MS-MS qualitative analysis of methanol extracts, LC-MS-MS quantitative analysis of 44 selected phenolic compounds in methanol extracts, determination of total monomeric anthocyanins content and alliinase activity. In order to assess the biological potential of methanol extracts, the antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, antimutagenic, genotoxic and antiproliferative activities of the extracts were studied.

Summing up all the results obtained, it can be concluded that species of genus *Allium* sect. *Codonoprasum* are rich sources of biologically active compounds with a broad spectrum of biological activities. Dimethyl disulfide is the most dominant and often the only volatile component of most species, which is significant from chemotaxonomic point of view. The methanol extracts of investigated species contain high levels of flavonoids (primarily quercetin derivatives). Specificity of *A. pallens* and *A. oleraceum* extracts is that they do not contain rutin, but contain hyperoside, while small quantity of phenolic compounds is characteristic for *A. rhodopeum* extract. All investigated species, except of *A. flavum*, are rich in anthocyanins. Alliinase activity was high in all examined species. Most of the extracts, except *A. carinatum* and *A. melanantherum* extracts, express considerable antioxidant activity, while extracts of *A. flavum*, *A. rhodopeum*, *A. paniculatum* and *A. oleraceum* are potent anti-inflammatory agents. The investigated *Allium* extracts did not show antimicrobial and antimutagenic activity. Also, the extracts did not express genotoxic effect on healthy tissue cells (except the weak genotoxic effects of aerial parts extract of *A. flavum*), indicating that the use of these species as a food or as a drug is safe. Whole plant extracts of *A. paniculatum* and *A. rhodopeum*, as well as aerial parts extract of *A. melanantherum* showed strong antiproliferative activity (with a favorable non-tumor/tumor ratios) and induced apoptosis in tumor cells, suggesting that these plants have a high potential for application in antitumor therapy.

Accepted by the scientific board on:

ASB

Defended:

2014

DE

Thesis defend board:

(Degree/name/surname/title/faculty)

DB

Chairperson:

Dr Mirjana Popsavin, Full Professor, Faculty of Sciences,
University of Novi Sad

Mentor:

Dr Neda Mimica-Dukić, Full Professor, Faculty of Sciences,
University of Novi Sad

Member:

Dr Goran Anačkov, Assistant Professor, Full Professor,
Faculty of Sciences, University of Novi Sad

Member:

Dr Biljana Božin, Associate Professor, Faculty of Sciences,
University of Novi Sad

Member:

Dr Dragana Četojević-Simin, Research Associate, Oncology
Institute of Vojvodina, Medical Faculty, University of Novi
Sad

Dr Dragana Mitić-Ćulafić, Research Associate Faculty of
Biology, Belgrade