

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

**KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU – DOKTORSKE STUDIJE**

Na sednici Nastavno-naučnog veća Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta, održanoj 08.04.2021. god., Odlukom broj 649/2, imenovani su članovi Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidatkinje mag. farm. Violete M. Milutinović, istraživača-saradnika finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (broj ugovora 451-03-9/2021-14/200161), pod nazivom:

**„Ispitivanje sekundarnih metabolita i farmakološke aktivnosti odabranih vrsta roda  
*Hieracium* L. (Asteraceae) sa Balkanskog poluostrva.“**

Komisija u sastavu:

1. Dr sc. Silvana Petrović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, mentor
2. Dr sc. Marjan Niketić, naučni i muzejski savetnik, Prirodnjački muzej, Beograd
3. Dr sc. Ljuboš Ušjak, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet
4. Dr sc. Miloš Petković, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet
5. Dr sc. Maja Tomić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet,

pregledala je priloženu disertaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta sledeći

**IZVEŠTAJ**

**1. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE**

Doktorska disertacija mag. farm. Violete M. Milutinović pod nazivom „**Ispitivanje sekundarnih metabolita i farmakološke aktivnosti odabranih vrsta roda *Hieracium* L. (Asteraceae) sa Balkanskog poluostrva**“, sastoji se iz sledećih poglavlja: Uvod, Cilj, Materijal i metode, Rezultati i diskusija, Zaključci, Literatura i Prilozi. Na početku, doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku i sadržaj, a na kraju spisak publikovanih i saopštenih radova koji čine deo doktorske disertacije, kratku biografiju kandidatkinje, kao i potpisane izjave kandidatkinje o autorstvu, istovetnosti štampane i elektronske verzije i korišćenju doktorske disertacije.

Doktorska disertacija je napisana na 182 strane sa jednostrukim proredom: Uvod (36 strana), Cilj (jedna strana), Materijal i metode (23 strane), Rezultati i diskusija (102 strane), Zaključci (četiri strane) i Literatura (16 strana); sadrži 76 slika (24 u Uvodu, jednu u Materijalu i metodama i 51 u Rezultatima i diskusiji), 47 tabela (pet u Uvodu, 13 u Materijalu i metodama i 29 u Rezultatima i diskusiji) i 316 literaturnih navoda. Prilozi doktorske disertacije su izrađeni na 29 strana i sadrže tri tabele i 74 slike.

U **Uvodu** su najpre date opšte karakteristike roda *Hieracium* L. (Asteraceae). Zatim su prikazani taksonomska pripadnost, botanički opis i rasprostranjenje 28 ispitivanih vrsta ovog roda, koje uključuju 12 nehibridogenih vrsta: *H. gymnocephalum* Griseb. ex Pant., *H. orienti* A. Kern., *H.*

*bleicii* Niketić, *H. paratrichum* Niketić, *H. spirocaule* Niketić, *H. mokragorae* (Nägeli & Peter) Nägeli & Peter, *H. pannosum* Boiss. s.l., *H. plumulosum* A. Kern., *H. villosum* Jacq., *H. pilosum* Schleich. ex Froel., *H. pseudoschenkii* (Rohlena & Zahn) Niketić i *H. naegelianum* Pančić; kao i 16 hibridogenih vrsta: *H. anastrum* (Degen & Zahn) Niketić, *H. calophyllum* R. Uechtr., *H. scheppigianum* Freyn, *H. durmitoricum* (Rohlena & Zahn) Niketić, *H. guentheri-beckii* Zahn, *H. mirificissimum* Rohlena & Zahn, *H. coloriscapum* Rohlena & Zahn, *H. pyricephalum* Niketić, *H. albopellitum* (Zahn) Niketić, *H. glabratum* Willd., *H. scorzonerifolium* Vill. s.l., *H. dentatum* Hoppe s.l., *H. valdepilosum* Vill. s.l., *H. neilreichii* Beck, *H. tommasinianum* K. Malý i *H. macrodontoides* (Zahn) Zahn.

Pregled do sada ispitivanih sekundarnih metabolita biljaka roda *Hieracium* s. str. dat je kroz odeljke: fenolkarboksilne kiseline, flavonoidi, seskviterpenski laktoni, triterpeni i kumarini. U sledećem odeljku predstavljena je primena vrsta roda *Hieracium* s. str. u narodnoj medicini i homeopatiji. U završnom odeljku uvodnog dela doktorske disertacije prikazani su rezultati prethodnih ispitivanja farmakološke aktivnosti (antioksidantne, antiedematozne, gastroprotektivne, citotoksične, antimikrobne, anti- $\alpha$ -glukozidazne i anti- $\alpha$ -amilazne) ekstraktata različitih organa ili delova biljaka ovog roda.

**Ciljevi istraživanja** su jasno definisani. Prvi cilj je hemijska karakterizacija 28 vrsta roda *Hieracium*: izolovanje seskviterpenskih laktona iz odabranog metanolnog (MeOH) ekstrakta cvasti i utvrđivanje njihove strukture; kvalitativna i kvantitativna analiza seskviterpenskih laktona u odabranim MeOH ekstraktima podzemnih organa (tj. rizoma i korena) i MeOH ekstraktima nadzemnih delova u cvetu (herbi) svih 28 vrsta; izolovanje fenolkarboksilnih kiselina iz odabranog MeOH ekstrakta podzemnih organa i utvrđivanje njihove strukture; kvalitativna i kvantitativna analiza fenolkarboksilnih kiselina u odabranim MeOH ekstraktima podzemnih organa i fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida u MeOH ekstraktima herbi svih 28 vrsta; kvalitativna i kvantitativna analiza triterpena u dihlorometanskim (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) ekstraktima herbi svih 28 vrsta, kao i multivarijantna statistička analiza rezultata hemijskih ispitivanja herbi u cilju procene homosistematskog značaja analiziranih sekundarnih metabolita. Drugi cilj je skrining farmakološke aktivnosti odabranih izolata ispitivanih vrsta roda *Hieracium*: ispitivanje antioksidantnog potencijala MeOH ekstrakata herbi svih 28 vrsta; ispitivanje antimikrobne i citotoksične aktivnosti odabranih MeOH i CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ekstrakata herbi i izolovanih seskviterpenskih laktona; ispitivanje sposobnosti MeOH ekstrakata herbi svih 28 vrsta i odabranih metabolita (flavonoida, fenolkarboksilnih kiselina i seskviterpenskih laktona) da inhibiraju enzime acetilholinesterazu i butirilholinesterazu, kao i ispitivanje antinociceptivne i antiedematozne aktivnosti, uticaja na motornu spretnost eksperimentalnih životinja i akutne toksičnosti odabranih MeOH i CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ekstrakata herbi.

U poglavlju **Materijal i metode** najpre je navedena aparatura korišćena za: pripremu ekstrakata, izolovanje seskviterpenskih laktona i fenolkarboksilnih kiselina (semipreparativnim LC-MS metodama), dobijanje frakcija bogatih triterpenima (hromatografijom u koloni na stubu silikagela), strukturnu karakterizaciju izolovanih seskviterpenskih laktona, fenolkarboksilnih kiselina [metodama LC-MS, LC-Q-TOF-MS/MS, kao i 1D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) i 2D (HSQC, HMBC, COSY, NOESY/ROESY) NMR spektroskopije i/ili refraktometrijom] i triterpena (metodama GC-FID-MS i 1D i 2D NMR spektroskopije), kvalitativnu i kvantitativnu analizu seskviterpenskih laktona, fenolkarboksilnih kiselina, flavonoida (LC-MS metodama) i triterpena (GC-FID-MS metodom), kao i aparatura za ispitivanje farmakološke aktivnosti odabranih izolata.

Zatim su dati podaci o sakupljenom biljnom materijalu: biljnim organima ili delovima (podzemni organi u slučaju *H. scheppigianum* i *H. naegelianum* i herbe u slučaju svih 28 ispitivanih vrsta), datumima i lokalitetima sakupljanja, kao i kolektorski brojevi. Opisan je postupak izrade suvog MeOH ekstrakta cvasti *H. calophyllum* i njegovog fracionisanja, kao i izrade suvih CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i MeOH ekstrakata podzemnih organa (dve vrste) i herbi (svih 28 vrsta); dati su i prinosi ekstrakcija.

U okviru odeljka **Hemijska analiza** u poglavlju **Materijal i metode** detaljno su opisane LC-MS metode korišćene za semipreparativno razdvajanje liofilizovane vodene frakcije MeOH ekstrakta cvasti *H. calophyllum*, u cilju izolovanja seskviterpenskih laktona, i suvog MeOH ekstrakta podzemnih organa *H. scheppigianum*, u cilju izolovanja fenolkarboksilnih kiselina, kao i metode

njihove strukturne karakterizacije. Opisan je postupak razdvajanja suvog CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ekstrakta herbe *H. gymnocephalum* primenom hromatografije u koloni na stubu silikagela, u cilju dobijanja frakcija bogatih triterpenima i njihova identifikacija. Zatim su dati eksperimentalni uslovi kvalitativne i kvantitativne LC-MS analize seskviterpenskog laktona u suvim MeOH ekstraktima podzemnih organa (*H. scheppigianum* i *H. naegilianum*) i herbi (svih 28 vrsta), fenolkarboksilnih kiselina u suvim MeOH ekstraktima podzemnih organa (*H. scheppigianum* i *H. naegilianum*) i herbi (svih 28 vrsta), i flavonoida u suvim MeOH ekstraktima herbi (svih 28 vrsta). Takođe, prikazani su eksperimentalni uslovi kvalitativne i kvantitativne GC-FID-MS analize triterpena u suvim CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ekstraktima herbi (svih 28 vrsta). Opisane su multivarijantne statističke metode korišćene u cilju evaluacije hemosistematskog značaja seskviterpenskog laktona, fenolkarboksilnih kiselina, flavonoida i triterpena identifikovanih u herbama svih 28 ispitivanih vrsta: analiza glavnih komponenti (PCA), nemetričko multidimenzionalno skaliranje (nMDS) i klaster analiza (UPGMA). Na kraju odeljka naveden je i postupak spektrofotometrijskog određivanja ukupnih polifenola u suvim MeOH ekstraktima herbi 28 vrsta.

U okviru odeljka **Farmakološka ispitivanja** u poglavlju **Materijal i metode** detaljno su opisane metode ispitivanja farmakoloških aktivnosti.

Antioksidantna aktivnost suvih MeOH ekstrakata herbi svih 28 vrsta ispitivana je *in vitro* spektrofotometrijskim testovima. Ukupan antioksidantni potencijal procenjen je testovima FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) i CUPRAC (engl. *Cupric Reducing Antioxidant Capacity*). Sposobnost neutralizacije slobodnih radikala ispitivana je DPPH testom (u cilju procene sposobnosti neutralizacije 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil, tj. DPPH• radikala), 2-dezoksiriboza testom (za procenu sposobnosti neutralizacije •OH radikala) i ABTS testom (za procenu sposobnosti neutralizacije 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina, tj. ABTS<sup>•+</sup> radikala).

*In vitro* bujon mikrodiluciona metoda korišćena je za ispitivanje antimikrobne aktivnosti suvih MeOH ekstrakata herbi *H. calophyllum*, *H. coloriscapum*, *H. pseudoschenkii*, *H. valdepilosum* i *H. glabratum* i suvog CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ekstrakta herbe *H. scheppigianum*, kao i aktivnosti dva izolovana seskviterpenska laktona, 8-epi-ikserisamina A i krepizida E. Antibakterijska aktivnost ekstrakata ispitivana je prema standardnim sojevima po tri vrste Gram-pozitivnih (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* i *Micrococcus flavus*) i Gram-negativnih bakterija (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*), kao i prema kliničkim izolatima po jedne vrste Gram-pozitivne (*Bacillus cereus*) i Gram-negativne bakterije (*Enterobacter cloacae*). Antifungalna aktivnost ekstrakata ispitivana je prema standardnim sojevima šest vrsta plesni (*Aspergillus versicolor*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *Trichoderma viride*, *Penicillium funiculosum*, *P. ochrochloron*) i jedne vrste kvasnice (*Candida albicans*), zatim prema kliničkim izolatima po jedne vrste plesni (*A. fumigatus*) i kvasnice (*C. krusei*), kao i prema izolatu iz hrane jedne vrste plesni (*P. verrucosum* var. *cyclopium*). Aktivnost seskviterpenskog laktona testirana je prema dve bakterije (*B. cereus* i *M. flavus*) i četiri mikromicete (*A. ochraceus*, *P. funiculosum*, *C. albicans* i *C. krusei*).

*In vitro* spektrofotometrijski MTT (engl. *Microculture tetrazolium test*) test korišćen je za utvrđivanje citotoksične aktivnosti odabranih izolata (istih onih za koje je sprovedeno ispitivanje antimikrobne aktivnosti) prema tri humane tumorske ćelijske linije: HeLa (ćelijska linija karcinoma grlića materice), LS174 (ćelijska linija adenokarcinoma debelog creva) i A549 (ćelijska linija nesitnoćelijskog karcinoma pluća), a dodatno, u cilju ispitivanja selektivnosti ovog efekta, i prema jednoj normalnoj ćelijskoj liniji MRC-5 (ćelijska linija fetalnih fibroblasta pluća).

Sposobnost suvih MeOH ekstrakata herbi svih 28 vrsta, kao i odabranih sekundarnih metabolita, tj. flavonoida (luteolina, apigenina, njihovih 7-*O*-glukozida i 7-*O*-glukuronida, kao i diosmetina), fenolkarboksilnih kiselina (hlorogenske, 1,3- i 3,5-di-*O*-kafeoilnina kiselina), kao i seskviterpenskog laktona (8-epi-ikserisamina A i krepizida E), da inhibiraju enzime acetilholinesterazu i butirilholinesterazu, ispitivana je pomoću *in vitro* spektrofotometrijske modifikovane Ellman-ove metode.

Antihiperalgezijska i antiedematozna aktivnost suvih MeOH ekstrakata herbi *H. glabratum* i *H. calophyllum* i suvog CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ekstrakta herbe *H. scheppigianum*, ispitivane su nakon oralne

primene, u modelu lokalizovane inflamacije u pacova izazvane intraplantarnom (*i.pl.*) injekcijom karagenina. Antihiperalgezijska aktivnost ispitivana je korišćenjem električnog *Von Frey* uređaja, merenjem mehaničke sile kojom se deluje na šapu i koja izaziva reakciju životinje (povlačenje šape). Antiedematozna aktivnost ispitivana je merenjem zapremine šape pletizmometrom. Rotarod testom procenjivan je uticaj suvog MeOH ekstrakta herbe *H. glabratum* i suvog CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ekstrakta herbe *H. scheppigianum* na motornu spretnost pacova i validirani su rezultati ispitivanja antihiperalgezijske aktivnosti. Akutna toksičnost ova dva ekstrakta ispitana je na miševima, nakon jednokratne primene velike doze ekstrakata.

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije pregledno su prikazani i diskutovani u poglavlju **Rezultati i diskusija** na 102 strane teksta, kroz 51 sliku i 29 tabela. Ovo poglavlje dopunjeno je **Prilozima** na 29 strana, koji sadrže tri tabele i 74 slike. Kandidatkinja je svoje rezultate detaljno uporedila sa odgovarajućim rezultatima drugih autora.

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

U poglavlju **Literatura** dat je spisak literaturnih navoda (316) citiranih harvardskim stilom.

## 2. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

U okviru ove doktorske disertacije ispitivano je 28 vrsta roda *Hieracium* s. str., od čega 12 nehibridogenih vrsta (osam iz sekcije *Pannosa*, dve iz sekcije *Villosa* i po jedna iz sekcija *Drepanoidea* i *Naegeliana*) i 16 hibridogenih vrsta (nastalih ukrštanjem vrsta iz sekcija *Pannosa*, *Naegeliana*, *Drepanoidea*, *Prenanthoidea*, *Villosa*, *Glauciformia*, *Hieracium* i/ili *Italica*). Herbe 28 vrsta, a u slučaju *H. scheppigianum* i *H. naegelianum* i podzemni organi sakupljeni su na karakterističnim lokalitetima u Crnoj Gori i Srbiji (najveći broj uzoraka na planini Durmitor). Hemijski sastav 19 vrsta i farmakološka aktivnost 26 vrsta (od 28 vrsta koje su predmet ove doktorske disertacije) ispitivani su po prvi put.

Iz MeOH ekstrakta cvasti *H. calophyllum*, semipreparativnom tečnom hromatografijom (LC-MS), izolovana su četiri seskviterpenska laktona i strukturno okarakterisana primenom tandem masene spektrometrije (Q-TOF-MS/MS), 1D i 2D NMR spektroskopije i refraktometrije. Izolovani konjugati sa prolinom: eudezmanolidni glukozid kalofilamin B, gvajanolid kalofilamin A i gvajanolidni glukozid 8-epi-ikserisamin A predstavljaju nova, do sada neopisana jedinjenja, dok je gvajanolidni glukozid krepizid E izolovan po prvi put iz vrste roda *Hieracium*.

Izolovana jedinjenja korišćena su kao eksterni standardi za uporednu kvalitativnu i kvantitativnu LC-MS analizu seskviterpenskih laktona u suvim MeOH ekstraktima podzemnih organa dve vrste (*H. scheppigianum* i *H. naegelianum*), kao i suvim MeOH ekstraktima herbi svih 28 vrsta. U ekstraktima podzemnih organa *H. scheppigianum* i *H. naegelianum* ustanovljeno je prisustvo samo krepizida E i to u količini (126,88 i 116,58 mg/g suvog ekstrakta) koja je bila značajno veća ne samo u odnosu na sadržaj ukupnih seskviterpenskih laktona u ekstraktima herbi ove dve vrste (u kojima su identifikovani i kalofilamin A i 8-epi-ikserisamin A), već i u odnosu na sadržaj ukupnih seskviterpenskih laktona u ekstraktima herbi svih 28 vrsta (u kojima je identifikovano od dva do četiri seskviterpenska laktona; ukupni sadržaj seskviterpenskih laktona kretao se od tragova u slučaju jedne vrste do 28,90 mg/g). Najveći sadržaj ukupnih seskviterpenskih laktona u ekstraktima herbi ustanovljen je u *H. valdepilosum*, *H. calophyllum*, *H. gymnocephalum*, *H. pyricephalum*, *H. coloriscapum*, *H. bleicii*, *H. scheppigianum*, *H. guentheri-beckii* i *H. anastrum* (19,94-28,90 mg/g). U ekstraktima herbi krepizid E je identifikovan u 26 vrsta (u količini od 0,26 mg/g u *H. pilosum* do 18,23 mg/g u *H. coloriscapum*), od čega je u 21 vrsti bio i nazastupljeniji, a u 13 vrsta ga je bilo u značajnoj količini (8,68-18,23 mg/g). 8-Epi-ikserisamin A i kalofilamin A identifikovani su u svih 28 vrsta (bili su prisutni u tragovima u pet istih vrsta do najviše 11,14 mg/g u *H. guentheri-beckii*, odnosno 5,31 mg/g u *H. anastrum*). 8-Epi-ikserisamin A je bio najzastupljeniji u 3 vrste, a u značajnoj količini ga je bilo u devet vrsta (8,19-11,14 mg/g), dok je kalofilamin A bio najzastupljeniji samo u *H. pilosum*, a u značajnoj količini ga je bilo u pet vrsta (4,53-5,31 mg/g). Kalofilamin B je

identifikovan u 14 vrsta i u svima je bio zastupljen u veoma malim količinama (u tragovima u slučaju dve vrste do najviše 0,88 mg/g u *H. calophyllum*).

U suvim MeOH ekstraktima podzemnih organa *H. scheppigianum* i *H. naegelianum* ispitivane su i fenolkarboksilne kiseline. Semipreparativnom tečnom hromatografijom (LC-MS), iz ekstrakta *H. scheppigianum* izolovane su hlorogenska i 3,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina, koje su identifikovane pomoću komercijalnih standarda, kao i 1,3-, 3,4- i 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina, koje su strukturno okarakterisane primenom ESI/SQ-MS spektrometrije, UV, 1D i 2D NMR spektroskopije. 1,3-Di-*O*-kafeoilhina kiselina identifikovana je po prvi put u vrstama roda *Hieracium* u okviru ove doktorske disertacije. Navedenih 5 fenolkarboksilnih kiselina, korišćenih kao eksterni standardi, identifikovano je LC-MS metodom i u ekstraktu *H. naegelianum*. LC-MS analiza omogućila je detekciju još jedne dikafeoilhina kiseline u oba ekstrakta i pokazala da su ovi ekstrakti bili slični i u pogledu kvantitativnog sastava (sadržaj ukupnih fenolkarboksilnih kiselina 139,77 i 156,62 mg/g suvog ekstrakta): u oba je bila dominantna 3,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina (62,01 i 72,86 mg/g), a po zastupljenosti je sledila hlorogenska kiselina (35,61 i 36,90 mg/g).

U suvim MeOH ekstraktima herbi svih 28 vrsta izvršena je uporedna LC-MS analiza fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida. U ekstraktima herbi identifikovane su ukupno 3 fenolkarboksilne kiseline i 13 flavonoida (a detektovane su još 2 fenolkarboksilne kiseline i 6 flavonoida). Kvalitativna analiza, sprovedena na osnovu UV i masenih spektara (ESI/SQ-MS), i pomoću standardnih supstanci, pokazala je da su hlorogenska, 3,5- i 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina, luteolin 7-*O*-glukoksilozid, luteolin 7-*O*-glukozid i apigenin 7-*O*-glukozid zastupljeni u ekstraktima svih 28 vrsta, luteolin i apigenin u 27 vrsta, luteolin 7-*O*-glukuronid, apigenin 7-*O*-glukuronid i apigenin 7-*O*-rutinozid u 26 vrsta, luteolin 7-*O*-rutinozid u 24 vrste, luteolin 4'-*O*-glukozid, luteolin 4'-*O*-glukuronid i diosmetin u 23 vrste, a kvercetin 3-*O*-glukozid u 19 vrsta. Kvantitativna analiza je pokazala da je sadržaj ukupnih fenolkarboksilnih kiselina u ekstraktima herbi svih 28 vrsta (20,17-64,17 mg/g suvog ekstrakta) bio značajno niži u odnosu na ekstrakte podzemnih organa *H. scheppigianum* i *H. naegelianum*; najzastupljenije su bile hlorogenska (od 10,65 mg/g u *H. bleicicii* do 34,65 mg/g u *H. glabratum*) i 3,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina (od 4,48 mg/g u *H. gymnocephalum* do 33,13 mg/g u *H. neilreichii*). Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima herbi kretao se od 31,48-205,19 mg/g suvog ekstrakta. Osim u ekstraktu herbe *H. neilreichii*, u ekstraktima herbi ostalih 27 vrsta flavonoidi su bili zastupljeniji polifenoli u odnosu na fenolkarboksilne kiseline. Najveći sadržaj flavonoida (205,19 mg/g), a ujedno i ukupnih polifenola (269,36 mg/g) utvrđen je za ekstrakt herbe *H. glabratum*. Među flavonoidima, u ekstraktima najvećeg broja (25) vrsta, dominantni su bili luteolin i njegovi heterozidi (34,16-173,52 mg/g), s tim što je sadržaj pojedinačnih jedinjenja među vrstama značajno varirao. Na primer, sadržaj luteolin 7-*O*-glukozida i 7-*O*-glukoksilozida kretao se od 2,18 i 4,71 mg/g u *H. mokragorae* do 49,20 i 34,82 mg/g u *H. naegelianum*; sadržaj luteolin 7-*O*-glukuronida od tragova (u četiri vrste) do 118,94 mg/g u *H. glabratum*; a sadržaj luteolin 4'-*O*-glukuronida od tragova (u četiri vrste) do 41,20 mg/g u *H. valdepilosum*.

U odgovarajućim frakcijama suvog CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ekstrakta herbe *H. gymnocephalum*, dobijenim tečnom hromatografijom u koloni na stubu silikagela, detektovano je pet triterpena primenom gasne hromatografije (GC-FID-MS). Na osnovu masenih i 1D i 2D NMR spektara ova jedinjenja su identifikovana kao  $\beta$ -amirin,  $\beta$ -amirin-acetat,  $\alpha$ -amirin,  $\alpha$ -amirin-acetat i lupeol-acetat. Uporedna kvalitativna i kvantitativna GC-FID-MS analiza triterpena u suvim CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ekstraktima herbi svih 28 vrsta izvršena je pomoću standardnih supstanci. Najveći sadržaj ukupnih triterpena detektovan je u ekstraktu *H. durmitoricum* (148,59 mg/g suvog ekstrakta), a najmanji u ekstraktu *H. glabratum* (31,78 mg/g). U ekstraktima svih vrsta najzastupljeniji je bio  $\alpha$ -amirin (22,72-88,92 mg/g), a po količini ga je sledio  $\alpha$ -amirin-acetat (4,38-51,35 mg/g). Ostali triterpeni su bili zastupljeni u znatno manjim količinama, i to  $\beta$ -amirin (1,42-10,40 mg/g) i  $\beta$ -amirin-acetat (0,86-8,63 mg/g) u po 27 vrsta, a lupeol-acetat u svega 10 vrsta (2,83-10,14 mg/g).

Hemosistematski značaj seskviterpenskih laktona, flavonoida, fenolkarboksilnih kiselina i triterpena identifikovanih u ekstraktima herbi 28 ispitivanih vrsta procenjen je multivarijantnim statističkim metodama (PCA, nMDS i UPGMA). Kao najpouzdaniji hemosistematski markeri pokazali su se flavonoidi i fenolkarboksilne kiseline. Statistička analiza sadržaja ovih polifenola u

ekstraktima pokazala je jasno odvajanje pripadnika različitih sekcija i neformalnih grupa, kao i pozicioniranje hibridogenih vrsta uglavnom između roditeljskih vrsta. Statističkom analizom sadržaja seskviterpenskih laktona i triterpena konstatovana su izvesna preklapanja grupa, ali rezultati prevashodno PCA i nMDS analiza, generalno podržavaju diferencijaciju između glavnih grupa i u skladu su sa trenutno prihvaćenom taksonomskom klasifikacijom roda *Hieracium*. Kalofilamin B i lupeol-acetat mogli bi biti dobri hemosistematski markeri za pojedine ispitivane grupe: kalofilamin B za vrste koje pripadaju ili nastaju ukrštanjem vrsta iz sect. *Villosa* (osim *H. neilreichii*), kao i za vrste koje nastaju ukrštanjem vrsta iz sect. *Glauciformia* i sect. *Italica* (*H. tommasinianum* grupa), a lupeol-acetat za većinu nehibridogenih vrsta koje pripadaju sect. *Pannosa*, kao i za pojedine hibridogene vrste koje nastaju ukrštanjem vrste *H. gymnocephalum* iz ove sekcije sa vrstama drugih sekcija.

Za suve MeOH ekstrakte herbi svih 28 vrsta roda *Hieracium*, *in vitro* spektrofotometrijski, utvrđen je značajan ukupni antioksidantni potencijal FRAP (1,03-2,65 mmol Fe<sup>2+</sup>/g suvog ekstrakta) i CUPRAC (1,20-3,40 mmol Trolox/g suvog ekstrakta) testom i pokazana snažna koncentraciono zavisna sposobnost neutralizacije DPPH<sup>•</sup> (SC<sub>50</sub><sup>1</sup>=14,20-60,00 µg/mL), ABTS<sup>•+</sup> (SC<sub>50</sub>=5,58-18,74 µg/mL) i •OH radikala (SC<sub>50</sub>=12,11-24,45 µg/mL; svega četiri ekstrakta nisu postigla 50% inhibicije •OH radikala). Rezultati su bili u korelaciji sa sadržajem ukupnih polifenola određenim uz korišćenje FC reagensa (54,62-168,85 mg GAE<sup>2</sup>/g suvog ekstrakta). Naime, najveći sadržaj ukupnih polifenola utvrđen je za ekstrakte *H. glabratum*, *H. mirificissimum* i *H. naegelianum* (168,85; 105,12 i 102,30 mg GAE/g suvog ekstrakta), najbolja ukupna antioksidantna aktivnost za ekstrakte *H. glabratum* i *H. mirificissimum* (FRAP vrednosti 2,65 i 2,09 mmol Fe<sup>2+</sup>/g suvog ekstrakta; CUPRAC vrednosti 3,33 i 3,40 mmol Trolox/g suvog ekstrakta), a najснаžnija antiradikalna aktivnost za ekstrakte *H. glabratum* i *H. naegelianum* (SC<sub>50</sub> vrednosti 14,20 i 20,19 µg/mL prema DPPH<sup>•</sup> radikalu, 5,58 i 6,84 µg/mL prema ABTS<sup>•+</sup> radikalu, odnosno 12,11 i 15,18 µg/mL prema •OH radikalu). Primećena su i izvesna odstupanja od ovog pravila koja bi mogla da se objasne sadržajem pojedinih jedinjenja (npr. ekstrakt *H. macrodontoides* je ispoljio nižu antiradikalnu aktivnost od očekivane usled nižeg sadržaja flavonoidnih aglikona na račun heterozida koji su manje aktivni).

Antimikrobna aktivnost na osnovu hemijskog sastava odabranih suvih ekstrakata herbi (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ekstrakta *H. scheppigianum* i MeOH ekstrakata *H. calophyllum*, *H. coloriscapum*, *H. pseudoschenkii*, *H. valdepilosum* i *H. glabratum*), kao i izolovanih seskviterpenskih laktona 8-epi-ikserisamina A i krepizida E, ispitana je *in vitro* bujon mikrodilucionim testom. Ekstrakti su inhibirali rast svih osam testiranih vrsta bakterija (MIK<sup>3</sup>≥1,68 mg/mL; MBK≥3,36 mg/mL) i deset vrsta plesni i kvasnica (MIK≥2,48 mg/mL; MFK≥4,96 mg/mL). Najbolju aktivnost ekstrakti su ispoljili prema bakterijama *S. typhimurium* (MIK=1,68-6,80 mg/mL; MBK=3,36-10 mg/mL) i *P. aeruginosa* (MIK=2,52-19,84 mg/mL; MBK=5-39,68 mg/mL), kao i kvasnicama *C. albicans* (MIK=2,48-3,74 mg/mL; MFK=4,96-7,48 mg/mL) i *C. krusei* (MIK=4,96-7,48 mg/mL; MFK=9,92-14,96 mg/mL). Generalno, najbolju antimikrobnu aktivnost pokazao je MeOH ekstrakt *H. valdepilosum*, a sledio ga je CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ekstrakt *H. scheppigianum*. Utvrđena antimikrobna aktivnost može se barem delom objasniti prisustvom pojedinih triterpena (u slučaju CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ekstrakta) i polifenola (u slučaju MeOH ekstrakata), za koje je aktivnost prema nekim od ispitivanih bakterija i mikromiceta prethodno pokazana. Aktivnost MeOH ekstrakata prema plesnima *A. ochraceus* i *P. funiculosum*, kao i kvasnicama *C. albicans* i *C. krusei*, može se dodatno objasniti i prisustvom seskviterpenskih laktona, 8-epi-ikserisamina A i krepizida E, za koje je aktivnost prema ovim mikromicetama pokazana u okviru ove doktorske disertacije (MIK=0,15-0,4 mg/mL; MFK=0,3-0,8 mg/mL, osim u slučaju 8-epi-ikserisamina A prema *A. ochraceus*).

Citotoksična aktivnost odabranih suvih ekstrakata herbi (istih za koje je ispitivana i antimikrobna aktivnost), kao i 8-epi-ikserisamina A i krepizida E ispitivana je *in vitro* spektrofotometrijskim MTT testom. Ekstrakti su bili aktivni prema svim testiranim tumorskim ćelijskim linijama: karcinoma

<sup>1</sup> SC<sub>50</sub> - koncentracija izolata koja dovodi do neutralizacije 50% slobodnih radikala

<sup>2</sup> GAE - ekvivalent galne kiseline

<sup>3</sup> MIK - minimalna inhibitorna koncentracija; MBK/MFK - minimalna bakteriocidna/fungicidna koncentracija

grlića materice (HeLa;  $IC_{50}^4=148,12-303,22 \mu\text{g/mL}$ ), karcinoma debelog creva (LS174;  $IC_{50}=308,86-689,70 \mu\text{g/mL}$ ) i nesitnoćelijskog karcinoma pluća (A549;  $IC_{50}=294,04-869,64 \mu\text{g/mL}$ ), pri čemu je HeLa ćelijska linija bila najosetljivija. Najbolji efekat na sve tri ćelijske linije pokazao je  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ekstrakt *H. scheppegianum*, što se može barem delom objasniti prisustvom odgovarajućih triterpena za koje je prethodno pokazan efekat prema nekim od navedenih tumorskih ćelija. Citotoksična aktivnost MeOH ekstrakata nije bila u korelaciji sa sadržajem ukupnih polifenola, ali je aktivnost na HeLa ćelije bila u korelaciji sa sadržajem krepizida E. Krepizid E je pokazao bolji citotoksični efekat na ove ćelije u odnosu na 8-epi-ikserisamin A ( $IC_{50}$  vrednosti 46,19 i 100  $\mu\text{g/mL}$ , redom). Ispitivani ekstrakti ( $IC_{50}\geq 249,81 \mu\text{g/mL}$ ) i jedinjenja ( $IC_{50}\geq 92,23 \mu\text{g/mL}$ ) su vrlo slabo inhibirali rast zdravih ćelija fetalnih fibroblasta pluća (MRC-5), što je ukazalo na potencijalnu bezbednost primene ovih izolata.

Primenom modifikovane Elmann-ove metode, *in vitro* spektrofotometrijski pokazano je da su suvi MeOH ekstrakti herbi 27 od 28 ispitivanih vrsta koncentraciono zavisno inhibirali više od 50% aktivnosti enzima acetilholinesteraze (AChE;  $IC_{50\text{AChE}}^5=0,64-1,39 \text{ mg/mL}$ ), dok su ekstrakti samo sedam vrsta postigli više od 50% inhibicije enzima butirilholinesteraze (BChE;  $IC_{50\text{BChE}}=0,56-1,30 \text{ mg/mL}$ ). Istom metodom ispitivana je i anti-AChE i anti-BChE aktivnost odabranih metabolita i to sedam flavonoida (luteolina i apigenina, njihovih 7-*O*-glukozida i 7-*O*-glukuronida i diosmetina), tri fenolkarboksilne kiseline (hlorogenske kiseline, 3,5- i 1,3-di-*O*-kafeoilhina kiseline) i dva seskviterpenska laktone (8-epi-ikserisamina A i krepizida E). Flavonoidni aglikoni apigenin ( $IC_{50\text{AChE}}=47,12 \mu\text{g/mL}$ ;  $IC_{50\text{BChE}}=18,40 \mu\text{g/mL}$ ), luteolin ( $IC_{50\text{AChE}}=58,82 \mu\text{g/mL}$ ;  $IC_{50\text{BChE}}=20,12 \mu\text{g/mL}$ ) i diosmetin ( $IC_{50\text{AChE}}=89,89 \mu\text{g/mL}$ ;  $IC_{50\text{BChE}}=73,44 \mu\text{g/mL}$ ) pokazali su značajnu aktivnost prema oba enzima, koja je bila nešto bolja prema BChE. Sa druge strane, flavonoidni heterozidi pokazali su znatno slabiju aktivnost u odnosu na aglikone, koja je u ovom slučaju bila nešto bolja prema AChE. U koncentraciji 160  $\mu\text{g/mL}$ , apigenin 7-*O*-glukuronid pokazao je najbolju aktivnost prema AChE (38,47%), a apigenin 7-*O*-glukozid prema BChE (31,74%). Od fenolkarboksilnih kiselina, značajniju inhibiciju enzimske aktivnosti pokazala je 1,3-di-*O*-kafeoilhina kiselina prema AChE (41,00% u koncentraciji 160,00  $\mu\text{g/mL}$ ). Među ostalim ispitivanim jedinjenjima više od 50% inhibicije enzimske aktivnosti pokazao je 8-epi-ikserisamin A u slučaju AChE ( $IC_{50}=80,01 \mu\text{g/mL}$ ). Krepizid E je pokazao slabiju aktivnost prema oba enzima, inhibirajući 19,32% aktivnosti AChE i 22,79% aktivnosti BChE u koncentraciji 160,00  $\mu\text{g/mL}$ .

U modelu lokalizovane inflamacije šape pacova indukovane karageninom, ispitane su antihiperlgezijska i antiedematozna aktivnost tri, na osnovu hemijskog sastava odabrana, suva ekstrakta vrsta roda *Hieracium*.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ekstrakt *H. scheppegianum* i MeOH ekstrakt *H. glabratum* (50-200 mg/kg, *p.o.*) pokazali su statistički značajnu i dozno zavisnu antihiperlgezijsku aktivnost (26,9-56,2% i 25,3-51,6%, redom, 60-90 min nakon tretmana;  $ED_{50}^6$  vrednosti  $163,0 \pm 26,5$  i  $211,6 \pm 70,6 \text{ mg/kg}$ , redom), uporedivu sa referentnim lekom ibuprofenom (100 mg/kg; *p.o.*; 61,1%, 90 min nakon primene), koja barem delom može da se objasni prisustvom identifikovanih triterpena u  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ekstraktu, odnosno polifenola (fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida) u MeOH ekstraktu. U skladu sa tim, MeOH ekstrakt *H. calophyllum* (200 mg/kg, *p.o.*), koji je u odnosu na MeOH ekstrakt *H. glabratum* imao niži sadržaj polifenola, pokazao je i niži antihiperlgezijski efekat (38,1%, 60 min nakon tretmana). Ispitivani ekstrakti u testiranim dozama nisu pokazali statistički značajan antiedematozni efekat. Bezbednost primene ekstrakata *H. scheppegianum* i *H. glabratum*, koji su pokazali značajnu antihiperlgezijsku aktivnost, pokazana je rotarod testom u pacova (200 mg/kg, *p.o.*) i testom akutne toksičnosti u miševa (pojedinačna doza 2000 mg/kg, *p.o.*).

<sup>4</sup>  $IC_{50}$  - koncentracija izolata koja inhibira preživljavanje 50% ćelija

<sup>5</sup>  $IC_{50\text{AChE}}/IC_{50\text{BChE}}$  - koncentracija izolata koja dovodi do inhibicije 50% aktivnosti enzima AChE/BChE.

<sup>6</sup>  $ED_{50}$  - doza koja ispoljava 50% antihiperlgezijske aktivnosti.

### 3. UPOREDNA ANALIZA POSTIGNUTIH REZULTATA SA PODACIMA IZ LITERATURE

*Hieracium* s. str. je jedan od najvećih i sistematski najsloženijih rodova skrivenosemenica koji, u zavisnosti od taksonomskog koncepta, uključuje različiti broj vrsta, od 500 do 5000 (Mráz i Zdvořák, 2019). Prema novijim klasifikacijama, ovaj rod u užem smislu više ne uključuje neke taksonone koji su bili u rangu podrodova ili sekcija i oni se sada vode kao nezavisni rodovi *Pilosella* Hill, *Stenotheca* Monnier i *Schlagintweitia* Griseb., i zajedno sa rodom *Hieracium* pripadaju podtribusu Hieraciine (Greuter 2006+; Kilian i sar. 2016; Sennikov i Illarionova, 2002). Rod *Hieracium* je autohton na teritoriji Evroazije, severne Afrike i Severne Amerike, sa centrima najvećeg diverziteta u Alpima i zapadnim delovima Evrope, kao i na Balkanskom poluostrvu i Srednjem Istoku (Kilian i sar., 2009). Kao sekundarni centar diverziteta, Balkansko poluostrvo je takođe i najbogatije u pogledu zastupljenosti drevnih diploidnih vrsta (Niketić i sar., 2006). Najveći diverzitet taksona konstatovan je u Dinaridima, a posebno na planini Durmitor (Crna Gora), sa više od šezdeset vrsta (u užem smislu) (Niketić i sar., 2003). Na ovom lokalitetu različite vrste obično koegzistiraju na istom staništu, sa istim tipom supstrata, što je posebno pogodno za komparativna hemosistematska ispitivanja. Stoga je za potrebe istraživanja u okviru ove doktorske disertacije većina vrsta (24 od 28) prikupljeno na planini Durmitor.

Pojedine vrste roda *Hieracium* s. str. koristile su se ili se koriste u narodnoj medicini. Od vrsta koje su ispitivane u ovoj doktorskoj disertaciji, zabeležena je primena osušenog soka iz korena *H. pannosum* u Turskoj (zapadna Anadolija) u cilju prevencije oboljenja usne duplje i održavanja njene higijene, kao i primena herbe *H. plumulosum* u Crnoj Gori (oblast Prokletija) kao sredstva za lečenje rana (Ari i sar., 2015; Petrović, 1996).

Vrste roda *Hieracium* s. str. su do sada samo delimično hemijski i farmakološki proučavane.

Seskviterpenski laktoni su do sada identifikovani samo u 2 vrste roda *Hieracium* s. str. Iz MeOH ekstrakta podzemnih organa *H. murorum* L. izolovan je germakranolid (15→1)- $\beta$ -D-glukopiranozil estar germakra-7 $\alpha$ H-1(10)E,4Z,11(13)-trien-12,8 $\alpha$ -olid-15-karboksilne kiseline. Iz hloroformskog (CHCl<sub>3</sub>) ekstrakta nadzemnih delova *H. bectauatensis* Kupr. izolovana su dva gvajanolida dezacilcinaropikrin i 11,13-dihidro-8-dezoksilaktucin (Adenkov, 2015; Kanafin i sar., 2015; Zidorn i sar., 2001).

U okviru ove doktorske disertacije, iz MeOH ekstrakta cvasti *H. calophyllum*, izolovana su tri nova, tj. do sada neopisana, konjugata seskviterpenskih laktona sa prolinom: eudezmanolidni glukozid kalofilamin B, gvajanolid kalofilamin A i gvajanolidni glukozid 8-epi-ikserisamin A. Prisustvo navedena dva nova gvajanolida zatim je utvrđeno u MeOH ekstraktima herbi svih 28 vrsta, a prisustvo sva tri nova seskviterpenska laktona u MeOH ekstraktima herbi 14 vrsta. Konjugati seskviterpenskih laktona sa prolinom su vrlo retki u prirodi i do sada su identifikovani samo u nekoliko vrsta drugih rodova familije Asteraceae (Cha i sar., 2012; Labeled i sar., 2019; Perveen i sar., 2018; Yang i sar., 2016; Zaima i sar., 2014). Na primer, ikserisamin A, čiji je 8-epi-ikserisamin A epimer, prethodno je izolovan iz MeOH ekstrakta cele biljke *Ixeris dentata* (Thunb. ex Thunb.) Nakai (Cha i sar., 2012). Iz MeOH ekstrakta cvasti *H. calophyllum* izolovan je i gvajanolidni glukozid krepizid E, i to po prvi put iz vrste roda *Hieracium*. Njegovo prisustvo je zatim utvrđeno i u MeOH ekstraktima podzemnih organa *H. scheppigianum* i *H. naegelianum*, kao i MeOH ekstraktima herbi 26 ispitivanih vrsta. Krepizid E je prethodno identifikovan samo u šest vrsta familije Asteraceae: u nepolarnom ekstraktu (cikoheksan:Et<sub>2</sub>O:H<sub>2</sub>O 1:1:1, V/V/V) herbe *Crepis incana* Sibth. & Sm., MeOH ekstraktu cele biljke *Youngia japonica* (L.) DC.<sup>7</sup>, vodenom ekstraktu (dekoktu) sveže biljke *Nabalus acerifolius* Maxim.<sup>8</sup>, acetonskom ekstraktu mlečnog soka *Lapsana communis* L. subsp. *communis*, EtOH ekstraktu (95%, V/V) cele biljke *Ainsliaea macrocephala* (Mattf.) Y.C. Tseng, i EtOH ekstraktu korena *Elephantopus scaber* L. (Barda i sar., 2018; Lee i sar., 2015; Wu i sar., 2011; Zidorn, 2008).

<sup>7</sup> Autori su za ovu vrstu koristili sinonim *Crepis japonica* (L.) Benth. (Hassler, 2019).

<sup>8</sup> Autori su za ovu vrstu koristili sinonim *Prenanthes acerifolia* Benth. (Hassler, 2019).



Fenolkarboksilne kiseline i flavonoidi su do sada identifikovani u više od 50 taksona roda *Hieracium* s. str., uglavnom u polarnim ekstraktima nadzemnih organa ili delova (u slučaju dve vrste dodatno i u ekstraktima podzemnih organa). Među fenolkarboksilnim kiselinama najčešće su identifikovane različite kafeoilhina kiseline (uglavnom hlorogenska, 3,5- i 4,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina, a samo u šest vrsta 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina, i u dve vrste izohlorogenska i 3,4-di-*O*-kafeoilhina kiselina). Od flavonoida, najčešće su detektovani flavoni apigenin i luteolin i njihovi heterozidi (monozidi i biozidi). Metil derivati luteolina, diosmetin i hrizoeriol, identifikovani su u svega dve, odnosno u jednoj vrsti, a flavonolni heterozid kvercetin 3-*O*-glukozid u samo dve vrste ovog roda (Giner i sar., 1992; Gökbulut i sar., 2017; Petrović i sar., 1999a; Sareedenchai i Zidorn, 2010; Švehlíková i sar., 2002; Zidorn i sar., 2002).

Od 28 vrsta roda *Hieracium*, koje su predmet ove doktorske disertacije, do sada je u pogledu kvalitativnog i/ili kvantitativnog sastava fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida ispitivano samo osam: MeOH ekstrakti herbi *H. gymnocephalum*, *H. blecicii*, *H. guentheri-beckii*, *H. coloriscapum* i *H. naegelianum*, MeOH ekstrakti korena, listova i cvasti *H. pannosum*, i polarni (MeOH:aceton:voda 3:1:1, V/V/V) ekstrakti cvasti *H. villosum* i *H. pilosum* (Gökbulut i sa. 2017; Petrović i sa. 1999a; Zidorn i sa. 2002). U preostalih 20 vrsta, kompozicija ovih sekundarnih metabolita do sada nije ispitivana.

U okviru ove doktorske disertacije, od fenolkarboksilnih kiselina, iz MeOH ekstrakta podzemnih organa *H. scheppigianum* izolovano je pet kafeoilhina kiselina (hlorogenska, 3,5-, 1,5-, 1,3- i 3,4-di-*O*-kafeoilhina kiselina), koje su zatim identifikovane i u MeOH ekstraktu podzemnih organa *H. naegelianum*. Dodatno, u oba ekstrakta podzemnih organa detekovana je još jedna dikafeoilhina kiselina. 1,3-Di-*O*-kafeoilhina kiselina identifikovana je po prvi put u vrstama roda *Hieracium* u okviru ove doktorske disertacije.

U MeOH ekstraktima herbi svih 28 vrsta identifikovane su u okviru ove doktorske disertacije hlorogenska, 3,5- i 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina; u 27 vrsta detektovana je još jedna monokafeoilhina kiselina, a u osam vrsta i dikafeoilhina kiselina koja je registrovana i u podzemnim organima. U MeOH ekstraktima herbi *H. gymnocephalum*, *H. blecicii*, *H. guentheri-beckii*, *H. coloriscapum* i *H. naegelianum* (Petrović i sar., 1999a), pored tragova kafene kiseline, prethodno su, kao i u okviru ove doktorske disertacije, identifikovane hlorogenska i 3,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina, a u ekstraktima *H. gymnocephalum*, *H. blecicii*, *H. guentheri-beckii* i *H. naegelianum* i 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina. U okviru ove doktorske disertacije, 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina detektovana je i u ekstraktu *H. coloriscapum*.

U prethodno ispitivanim polarnim ekstraktima cvasti *H. villosum* i *H. pilosum* (Zidorn i sar., 2002), pored 4,5-di-*O*-kafeoilhina kiseline, detektovane su, kao i u MeOH ekstraktima herbi ovih vrsta u okviru ove doktorske disertacije, hlorogenska i 3,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina. U okviru ove doktorske disertacije, u ekstraktima herbi identifikovana je dodatno i 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina. Kao i u MeOH ekstraktu herbe *H. pannosum* ispitivanom u okviru ove doktorske disertacije, u prethodno ispitivanim MeOH ekstraktima listova i cvasti ove biljke takođe je identifikovana hlorogenska kiselina (pored kafene kiseline) (Gökbulut i sar., 2017). U ekstraktu herbe su, u okviru ove doktorske disertacije, dodatno identifikovane 3,5- i 1,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina.

Što se tiče flavonoida, u okviru ove doktorske disertacije, u MeOH ekstraktima herbi svih 28 vrsta detektovano je ukupno 19 jedinjenja iz ove klase, i to luteolin i 9 njegovih heterozida, apigenin i četiri njegova heterozida i diosmetin i dva njegova heterozida, kao i kvercetin 3-*O*-glukozid. Aglikoni, luteolin i apigenin identifikovani su u 27 vrsta, a diosmetin u 23 vrste. Heterozidi, luteolin 7-*O*-glukoksilozid, luteolin 7-*O*-glukozid i apigenin 7-*O*-glukozid bili su prisutni u svim ispitivanim vrstama, luteolin 7-*O*-glukuronid, apigenin 7-*O*-glukuronid i apigenin 7-*O*-rutinozid u po 26 vrsta, luteolin 7-*O*-rutinozid u 24 vrste, luteolin 4'-*O*-glukozid i luteolin 4'-*O*-glukuronid u 23 vrste, a kvercetin 3-*O*-glukozid u 19 vrsta.

U MeOH ekstraktima herbi *H. gymnocephalum*, *H. blecicii*, *H. guentheri-beckii*, *H. coloriscapum* i *H. naegelianum* prethodno su identifikovani luteoin 7-*O*-glukozid, luteolin 7-*O*-rutinozid, luteolin 7-*O*-glukoksilozid i luteolin, a u ekstraktima *H. gymnocephalum*, *H. blecicii*, *H. guentheri-beckii* i *H. coloriscapum* takođe i apigenin 7-*O*-glukozid (Petrović i sar., 1999a). U okviru ove doktorske disertacije, apigenin 7-*O*-glukozid je detektovan i u ekstraktu *H.*

*naegelianum*, a dodatno, identifikovani su i luteolin 7-*O*-glukuronid i apigenin 7-*O*-rutinozid (u svih pet navedenih vrsta), luteolin 4'-*O*-glukuronid, apigenin i diosmetin (u četiri vrste; izuzev *H. naegelianum*), apigenin 7-*O*-glukuronid (u četiri vrste; izuzev *H. bleicicii*), luteolin 4'-*O*-glukozid (u *H. bleicicii*, *H. guentheri-beckii* i *H. coloriscapum*) i kvercetin 3-*O*-glukozid (u *H. gymnocephalum*, *H. bleicicii* i *H. naegelianum*).

Zidorn i sar. (2002) su u polarnim ekstraktima cvasti *H. villosum* i *H. pilosum* identifikovali luteolin, luteoin 7-*O*-glukozid, luteolin 7-*O*-glukuronid i luteolin 4'-*O*-glukozid, čije prisustvo je potvrđeno i u okviru ove disertacije u MeOH ekstraktima herbi ovih biljaka. U ekstraktima herbi obe biljke dodatno su identifikovani apigenin, diosmetin, luteolin 7-*O*-glukoksilozid, luteolin 4'-*O*-glukuronid, apigenin 7-*O*-rutinozid, apigenin 7-*O*-glukozid, apigenin 7-*O*-glukuronid i kvercetin 3-*O*-glukozid, a u ekstraktu herbe *H. villosum* i luteolin 7-*O*-rutinozid. Sa druge strane, Zidorn i sar. (2002) su u ekstraktima cvasti obe vrste identifikovali i izoetin 4'-*O*-glukuronid, koji nije detektovan u ekstraktima herbi u okviru ove doktorske disertacije.

Kao i u slučaju MeOH ekstrakta herbe *H. pannosum* ispitivanom u okviru ove doktorske disertacije, u prethodno ispitivanim ekstraktima listova i cvasti ove biljke identifikovani su apigenin, luteolin i luteolin 7-*O*-glukozid (Gökbulut i sar., 2017). U okviru ove doktorske disertacije, u ekstraktu herbe ove biljke dodatno su identifikovani luteolin 7-*O*-glukoksilozid, luteolin 7-*O*-glukuronid, luteolin 4'-*O*-glukozid, apigenin 7-*O*-rutinozid, apigenin 7-*O*-glukozid, apigenin 7-*O*-glukuronid i kvercetin 3-*O*-glukozid.

Do sada su u pogledu sastava triterpena ispitivana tri taksona roda *Hieracium*. U CHCl<sub>3</sub> ekstraktima herbi identifikovano je ukupno šest jedinjenja triterpenske strukture, i to: lupeol-acetat i  $\beta$ -amirin u *H. plumulosum*,  $\alpha$ - i  $\beta$ -amirin i 21- $\alpha$ -hidroksi-taraksasterol u *H. gymnocephalum*, kao i  $\alpha$ - i  $\beta$ -amirin, taraksasterol i lupeol u *H. umbellatum* subsp. *umbellatum* (Hooper i Chandler, 1984; Petrović i sar., 1996; 1999b). U okviru ove doktorske disertacije, u ekstraktima *H. gymnocephalum* i *H. plumulosum* dodatno su identifikovana dva triterpena, acetati  $\alpha$ - i  $\beta$ -amirina.

Hemosistematski značaj flavonoida i fenolkarboksilnih kiselina (ubikvitarnih klasa sekundarnih metabolita) i naročito seskviterpenskih laktona zastupljenih u ne tako velikom broju familija skrivenosemenica, do sada je pokazan naročito za biljke iz familije Asteraceae (Saredenchai i Zidorn, 2010; Zidorn i sar., 2002; Zidorn, 2008). U taksonima roda *Hieracium* s. str., seskviterpenski laktoni i triterpeni prethodno su sporadično ispitivani, zbog čega do sada nije rađena njihova hemosistematska evaluacija. Sa druge strane, prethodno je pokazan hemosistematski značaj flavonoida i fenolkarboksilnih kiselina u studijama koje su obuhvatile sekcije *Drepanoidea*, *Hieracium*, *Italica*, *Pannosa*, *Prenanthoidea* i *Villosa* (koje su predmet i ove doktorske disertacije), kao i 11 drugih sekcija ovog roda (Petrović i sar., 1999a; Saredenchai i Zidorn, 2010; Švehlíková i sar., 2002; Zidorn i sar., 2002). Doprinos ove doktorke disertacije se ogleda u činjenici da je po prvi put ispitivan hemosistematski značaj flavonoida i fenolkarboksilnih kiselina za navedenih 28 vrsta, kao i seskviterpenskih laktona i triterpena po prvi put za vrste roda *Hieracium*.

Od vrsta koje su predmet ove doktorske disertacije, antioksidantni potencijal je do sada ispitivan za nepolarni ekstrakt herbe *H. gymnocephalum* (pored antiedematozne i gastroprotektivne aktivnosti) (Petrović i sar., 2008) i za polarne ekstrakte korena, cvasti i listova *H. pannosum* (Gökbulut i sar., 2017). Nepolarni, suvi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ekstrakt herbe *H. gymnocephalum* pokazao je, u skladu sa hemijskim sastavom, umerenu sposobnost neutralizacije  $\cdot$ OH radikala u 2-dezoksiriboza testu (maksimalnih 39,3% neutralizacije u koncentraciji 2,5% *m/V*), i slabu sposobnost neutralizacije DPPH $\cdot$  radikala (SC<sub>50</sub>=60 mg/mL) i inhibicije lipidne peroksidacije u lipozomima (12,9% inhibicije u najvišoj testiranoj koncentraciji 10% *m/V*). Sa druge strane, ovaj ekstrakt bogat triterpenima ispoljio je dozno-zavisan antiedematozni efekat u modelu inflamacije šape pacova indukovane karageninom, kao i značajan gastroprotektivni efekat u modelu akutnog gastričnog ulkusa u pacova izazvanog indometacinom (Petrović i sar., 2008). Suvi MeOH ekstrakti korena, cvasti i listova *H. pannosum* pokazali su, u skladu sa hemijskim sastavom, značajnu sposobnost neutralizacije DPPH $\cdot$  radikala (SC<sub>50</sub> vrednosti 0,455, 0,767 i 0,776 mg/mL) i ABTS $^{++}$  radikala (SC<sub>50</sub> vrednosti 0,101, 0,258 i 0,240 mg/mL) (Gökbulut i sar., 2017). U okviru ove doktorske disertacije ustanovljene su značajna ukupna antioksidantna aktivnost (FRAP i CUPRAC testom) i

sposobnost neutralizacije DPPH<sup>\*</sup>, ABTS<sup>•+</sup> i <sup>\*</sup>OH radikala polarnih, suvih MeOH ekstrakata herbi 28 vrsta roda *Hieracium*. Dobijeni rezultati su u skladu sa utvrđenim hemijskim sastavom ovih ekstrakata. Naime, među jedinjenjima identifikovanim u ispitivanim ekstraktima, prethodno je snažna antiradikalska aktivnost pokazana za luteolin, apigenin, 3,5-di-*O*-kafeoilhina kiselinu, kvercetin 3-*O*-glukozid i luteolin 7-*O*-glukozid (SC<sub>50</sub>=2,17-5,18 µg/mL) prema DPPH<sup>\*</sup> radikalu, kao i za luteolin i kvercetin 3-*O*-glukozid (SC<sub>50</sub> vrednosti 2,60 i 3,80 µg/mL) prema ABTS<sup>•+</sup> radikalu (Yener i sar., 2020; Zheleva-Dimitrova i sar., 2017).

Antimikrobna aktivnost vrsta roda *Hieracium* prethodno je ispitivana za nepolarne, tj. *n*-heksanske ekstrakte korena, lista i stabljike *H. umbellatum* prema bakterijama *E. coli*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae* i *P. aeruginosa* i kvasnici *C. albicans* bujon mikrodilucionom i/ili disk difuzionom metodom (Kuluev i sar., 2019; Shvets i sar., 2019). Međutim, ovi ekstrakti nisu pokazali značajnu inhibiciju rasta navedenih mikroorganizama. Za razliku od prethodnih studija, u okviru ove doktorske disertacije bujon mikrodilucionom metodom ustanovljena je antimikrobna aktivnost odabranih suvih ekstrakata herbi (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ekstrakta *H. scheppigianum* i MeOH ekstrakata *H. calophyllum*, *H. coloriscapum*, *H. valdepiosum*, *H. pseudoschenkii* i *H. glabratum*), koja je bila u skladu sa njihovim hemijskim sastavom. Od sastojaka CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ekstrakta *H. scheppigianum*, do sada je za smeše  $\alpha$ - i  $\beta$ -amirina (1:2), kao i  $\alpha$ - i  $\beta$ -amirin-acetata pokazana aktivnost prema kvasnicama *C. albicans* i *C. krusei* (MIK=0,03-0,250 mg/mL), dok je za  $\alpha$ -amirin pokazana aktivnost prema bakterijama *S. aureus*, *S. typhimurium* i *E. coli* (MIK=0,37 mg/mL; MBK=0,75 mg/mL) (Ekalu i sar., 2019; Johann i sar., 2007). Za pojedine polifenole detektovane u ispitivanim MeOH ekstraktima takođe je pokazana antimikrobna aktivnost u prethodnim studijama. Luteolin 7-*O*-glukozid i hlorogenska kiselina pokazali su aktivnost prema bakterijama *S. typhimurium*, *E. coli* i *S. aureus* (MIK=0,1-0,15 mg/mL; MBK=0,1-0,2 mg/mL) i plesnima *T. viride*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *P. funiculosum* i *P. ochrochloron* (MIK=0,05-0,1 mg/mL; MFK=0,1 mg/mL), dok je 3,5-di-*O*-kafeoilhina kiselina ispoljila aktivnost prema bakterijama *S. aureus* i *P. aeruginosa* i plesni *A. niger* (MIK=0,1-0,2 mg/mL). Ove dve fenolkarboksilne kiseline značajno su inhibirale i rast kvasnice *C. albicans* (MIK=0,05-0,2 mg/mL) (Kukić i sar., 2008; Zhu i sar., 2004). Ustanovljena aktivnost MeOH ekstrakata prema plesnima *A. ochraceus* i *P. funiculosum*, kao i kvasnicama *C. albicans* i *C. krusei* može se dodatno objasniti i prisustvom seskviterpenskih laktona, 8-epi-ikserisamina A i krepizida E, za koje je aktivnost prema ovim mikromicetama pokazana u okviru ove doktorske disertacije. Za krepizid E je i prethodno evaluirana antimikrobna aktivnost i to prema pet vrsta patogenih bakterija i šest vrsta mikromiceta. Krepizid E je ispoljio značajnu aktivnost prema bakterijama *Enterococcus faecalis*, *P. aeruginosa* i *B. cereus*, i mikromicetama *A. versicolor* i *T. viride* (MIK=0,045 mg/mL; MFK=0,3 mg/mL) (Barda i sar., 2018). Dodatno, za dezacilcinaropikrin (1 mg/mL), jedinjenje koje predstavlja aglikon krepizida E je, u disk difuzionom testu, ustanovljen efekat prema bakterijama *E. coli* (9-10 mm) i *S. aureus* (16 mm) (Ndom i sar., 2006). Takođe je i za pojedine konjugate seskviterpenskih laktona i aminokiselina (jedinjenja strukture slične 8-epi-ikserisaminu A) antimikrobna aktivnost prethodno pokazana. Na primer, centaureolidi A i B, koji su izolovani iz MeOH ekstrakta cvasti *C. pungens*, ispoljili su aktivnost prema bakterijama *B. cereus*, *Listeria innocua*, *P. aeruginosa* i *P. fragi* (MIK 0,1-1 mg/mL) (Labed i sar., 2019).

Citotoksična aktivnost vrsta roda *Hieracium* prethodno je ispitivana *in vitro* MTT testom samo za *n*-heksanske, dihlormetanske i vodene frakcije MeOH ekstrakta, kao i za vodeni ekstrakt nadzemnih delova u cvetu *H. umbellatum* prema kancerskim ćelijskim linijama: HeLa (karcinom grlića materice), A-431 (epitelni epidermoidni karcinom kože) i MCF7 (epitelni adenokarcinom dojke). Navedeni ekstrakt i frakcije u ispitivanim koncentracijama (koje su bile niske i iznosile maksimalno 10 µg/mL) nisu postigle 50% inhibicije rasta ovih ćelija (Csupor-Löffler i sar., 2009). Sa druge strane, u okviru ove doktorske disertacije, odabrani ekstrakti (isti oni koji su ispitivani i u pogledu antimikrobne aktivnosti) testirani su u višim koncentracijama (takođe u MTT testu) i pokazali citotoksičnu aktivnost na sve tri tumorske ćelijske linije: HeLa, LS174 (karcinom debelog creva) i A549 (nesitnoćelijski karcinom pluća). Sposobnost suvog CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ekstrakta herbe *H. scheppigianum* da inhibira rast HeLa ćelija može se bar delom objasniti prisustvom  $\beta$ -amirina, čija

je citotoksična aktivnost prema ovoj ćelijskoj liniji prethodno ustanovljena ( $IC_{50}=19,72 \mu\text{g/mL}$ ) (Anburaj i sar., 2020). Od jedinjenja koja su identifikovana u ispitivanim MeOH ekstraktima, prethodno je pokazana antiproliferativna aktivnost luteolin 7-*O*-glukozida i apigenin 7-*O*-glukozida prema HeLa ćelijama ( $IC_{50}$  vrednosti 59,60 i 66,80  $\mu\text{g/mL}$ ), kao i luteolina i apigenina prema HeLa ( $IC_{50}$  vrednosti 4,41 i 8,99  $\mu\text{g/mL}$ ) i A549 ćelijama ( $IC_{50}$  vrednosti 16,91 i 12,55  $\mu\text{g/mL}$ ) (Kim i sar., 2014; Li i Yang, 2015; Mamadalieva i sar., 2011). Pored navedenih polifenola, ustanovljenoj citotoksičnoj aktivnosti ispitivanih MeOH ekstrakata prema HeLa ćelijskoj liniji, barem delom, doprineli su i 8-epi-ikserisamin A i krepizid E, čija je aktivnost prema ovoj ćelijskoj liniji pokazana u okviru ove doktorske disertacije. Citotoksični efekat krepizida E je i prethodno ispitivan i to prema humanim ćelijskim linijama melanoma (SK-MEL-2), kolorektalnog adenokarcinoma (HCT-15) i A549 *in vitro* SRB testom. Međutim, u opsegu testiranih koncentracija (koje su bile značajno niže u odnosu na koncentracije testirane u okviru ove doktorske disertacije; maksimalno 12,73  $\mu\text{g/mL}$ ) krepizid E nije postigao 50% inhibicije rasta ovih ćelija (Lee i sar., 2015).

*In vitro* ustanovljena sposobnost ispitivanih ekstrakata odabranih 28 vrsta roda *Hieracium* da inhibiraju AChE i BChE (primenom modifikovane Ellman-ove metode) može se, makar delom, objasniti prisustvom određenih sastojaka, koji su takođe testirani u okviru ove doktorske disertacije. Najbolja anti-AChE i anti-BChE aktivnost ustanovljena je za flavonoidne aglikone apigenin i luteolin, što je u saglasnosti sa prethodnim ispitivanjima drugih autora. Nešto slabija antiholinesterazna aktivnost diosmetina (metil derivata luteolina), kao i značajno slabija aktivnost heterozida (7-*O*-glukozida i 7-*O*-glukuronida luteolina i apigenina) može se, barem delom, objasniti prisustvom manjeg broja slobodnih fenolnih grupa, koje su neophodne za vezivanje za aktivno mesto navedenih enzima i njihovu inhibiciju. Testirane fenolkarboksilne kiseline (hlorogenska, 3,5- i 1,3-di-*O*-kafeoilnina kiselina) takođe su pokazale slabiju inhibiciju aktivnosti AChE i BChE. Utvrđena aktivnost hlorogenske kiseline je u skladu sa rezultatima prethodnih istraživanja ( $IC_{50\text{AChE/BChE}} \geq 672,10 \mu\text{g/mL}$ ) (Yener i sar., 2020). U okviru ove disertacije testirani 8-epi-ikserisamin A i krepizid E pokazali su slabiju antiholinesteraznu aktivnost u odnosu na prethodno ispitivane seskviterpenske laktone amberboin ( $IC_{50\text{AChE}}=0,21 \mu\text{g/mL}$ ;  $IC_{50\text{BChE}}=0,15 \mu\text{g/mL}$ ) i lipidiol ( $IC_{50\text{AChE}}=0,14 \mu\text{g/mL}$ ), izolovane iz vrste *Volutaria abyssinica* (A. Rich.) C. Jeffrey (Asteraceae). Aktivnost amberboina i lipidiola bila je čak izraženija u odnosu na aktivnost galantamina, standardnog inhibitora ovih enzima (Elsebai i sar., 2018). Amberboin i lipidiol imaju vrlo sličan gvajanolidni skelet kao i seskviterpenski laktoni testirani u ovoj doktorskoj disertaciji. Razlika u aktivnosti između prethodno i u ovoj doktorskoj disertaciji ispitivanih jedinjenja bi mogla, barem delom, da se objasni veličinom njihovih molekula. Naime, molekulska masa 8-epi-ikserisamin A i krepizida E je veća zbog prisustva glukoze. Nepovoljan uticaj molekulske mase inhibitora na njegov afinitet vezivanja za aktivno mesto enzima prethodno je pokazan u *in vitro* i *in silico* studijama (Yener i sar., 2020).

U okviru ove doktorske disertacije, u modelu lokalizovane inflamacije šape pacova izazvane karageninom, pokazana je antihiperalgezijska aktivnost oralno primenjenih odabranih ekstrakata: suvog  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ekstrakta herbe *H. scheppigianum* i suvih MeOH ekstrakti herbi *H. calophyllum* i *H. glabratum*. Ustanovljen antihiperalgezijski efekat suvog  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ekstrakta *H. scheppigianum* može se, barem delimično, objasniti prisustvom pojedinih identifikovanih triterpena. Naime, prethodno je za smešu  $\alpha$ - i  $\beta$ -amirina, kao i  $\beta$ -amirin i lupeol-acetat utvrđena aktivnost u animalnim modelima inflamatorne hiperalgezije. U modelu inflamacije šape pacova indukovane karageninom, koji je korišćen i u okviru ove doktorske disertacije, antihiperalgezijski efekat pokazala je smeša  $\alpha$ - i  $\beta$ -amirina (30 mg/kg; *i.p.*). U inflamatornoj fazi formalinskog testa ista smeša ispoljila je inhibiciju bolnog ponašanja pacova (5-100 mg/kg; *p.o.* i 10-100 mg/kg; *i.p.*) i miševa (0,1-10 mg/kg; *i.p.*) (Otuki i sar., 2005; Pinto i sar., 2008). U istom testu analgetički efekat u miševa utvrđen je i za  $\beta$ -amirin (5 i 10 mg/kg; *i.p.*), kao i lupeol-acetat (10-50 mg/kg; *i.p.*) (Chen i sar., 2012; Murade i sar., 2017). Antihiperalgezijski efekti suvih MeOH ekstrakata *H. glabratum* i *H. calophyllum* mogu se, barem delimično, objasniti prisustvom apigenin 7-*O*-glukuronida, luteolina i hlorogenske kiseline, koji su u prethodnim ispitivanjima pokazali analgetički efekat u inflamatornoj fazi formalinskog testa. U slučaju apigenin 7-*O*-glukuronida (10 i 20 mg/kg; *p.o.*) i luteolina (10 mg/kg; *p.o.*), efekat

je pokazan u miševa (Feng i sar., 2019; Ghosh i sar., 2013), a u slučaju hlorogenske kiseline (10, 50 i 100 mg/kg; *p.o.*) u pacova (dos Santos i sar., 2006).

Odabrani testirani ekstrakti (*p.o.*) nisu ispoljili statistički značajan uticaj na inflamatorni edem (u modelu inflamacije šape pacova indukovane karageninom), iako su neka od jedinjenja koja su identifikovana u ovim ekstraktima u prethodnim ispitivanjima pokazala antiedematoznu aktivnost. Naime, u slučaju triterpena, utvrđen je uticaj smeše  $\alpha$ - i  $\beta$ -amirina na edem šape indukovane karageninom nakon primene u miševa (25 i 50 mg/kg; *i.p.*) i pacova (100 mg/kg; *p.o.*) (Aragão i sar., 2008), kao i lupeol-acetata u miševa (2-50 mg/kg; *i.p.*) (Lucetti i sar., 2010) i pacova (100 mg/kg; *i.p.*) (Chen i sar., 2012). Što se tiče polifenola, nakon *p.o.* primene pokazan je efekat na edem šape indukovane karageninom u slučaju luteolina (1-100 mg/kg), luteolin 7-*O*-glukozida i apigenin 7-*O*-glukozida (u slučaju oba jedinjenja po 200 mg/kg) u miševa (Li i sar., 2011; Tatli i sar., 2008; Ziyani i sar., 2007) i hlorogenske kiseline (10, 50 i 100 mg/kg) u pacova (dos Santos i sar., 2006). Dodatno, u modelu inflamacije šape pacova indukovane karageninom, prethodno je i za suvi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ekstrakt herbe *H. gymnocephalum* (25-200 mg/kg, *p.o.*) ustanovljen antiedematozni efekat od 5,9-44,1% (Petrović i sar., 2008). Odsustvo statistički značajnog antiedematoznog efekta ekstrakata ispitivanih u okviru ove doktorske disertacije se može pripisati različitim primenjenim dozama (izolovana jedinjenja su pokazivala antiedematozni efekat obično u dozama većim od onih prisutnih u ekstraktima), načinima primene i/ili testiranim životinjama (korišćene su životinje različite vrste i/ili pola), kao i različitim koncentracijama karagenina kojima je indukovano edem (u slučaju ekstrakta herbe *H. gymnocephalum* bio je primenjen rastvor karagenina dvostruko niže koncentracije u odnosu na ispitivanje sprovedeno u okviru ove doktorske disertacije).

#### Citirana literatura

1. Adenkov SM. Searching for natural sesquiterpene lactones – sources of new drug substances, in: Proceeding of 2<sup>nd</sup> Russian Conference on Medicinal Chemistry, 6<sup>th</sup> Russian-Korean Conference "Current Issues of Biologically Active Compounds Chemistry and Biotechnology", 2<sup>nd</sup> Youth School-Conference on Medicinal Chemistry, Novosibirsk, Russia, 2015, str. 27.
2. Anburaj J, Swapna S, Amuthavalli K. Beta-amyrin modulates p38 mapk and jnk pathway to inhibit cell proliferation and induce ros-mediated apoptosis in hela cells. *Indian J Pharm Sci* 2020;82(3):420–428.
3. Aragão GF, Pinheiro MCC, Bandeira PN, Lemos TLG, Viana GSDB. Analgesic and anti-inflammatory activities of the isomeric mixture of alpha-and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *J Herb Pharmacother* 2008;7(2):31–47.
4. Ari S, Temel M, Kargioğlu M, Konuk M. Ethnobotanical survey of plants used in Afyonkarahisar-Turkey. *J Ethnobiol Ethnomed* 2015;11(1):1–15.
5. Barda C, Ciric A, Soković M, Tsoukalas M, Skaltsa H. Phytochemical investigation of *Crepis incana* Sm.(Asteraceae) endemic to southern Greece. *Biochem Syst Ecol* 2018;80:59–62.
6. Cha MR, Choi CW, Lee JY, Kim YS, Yon GH, Choi SU, Kim YH, Ryu SY. Two new amino acid-sesquiterpene lactone conjugates from *Ixeris dentata*. *Bull Korean Chem Soc* 2012;33:337–340.
7. Chen YF, Ching C, Wu TS, Wu CR, Hsieh WT, Tsai HY. *Balanophora spicata* and lupeol acetate possess antinociceptive and anti-inflammatory activities *in vivo* and *in vitro*. *Evid-Based Compl Alt* 2012; 2012:1–11.
8. Csupor-Löffler B, Hajdú Z, Réthy B, Zupkó I, Máthé I, Rédei T, Falkay G, Hohmann J. Antiproliferative activity of hungarian Asteraceae species against human cancer cell lines. Part II. *Phytother Res* 2009;23(8):1109–1115.
9. Ekalu MA, Ayo RGO, Habila J, Hamisu I. Bioactivity of phaeophytin a,  $\alpha$ -Amyrin and lupeol from *Brachystelma togoense* Schltr. *JOTCSA* 2019;6(3):411–418.
10. Elsebai MF, Ghabbour HA, Marzouk AM, Salmas RE, Orhan IE, Senol FS. Amberboin and lipidiol: X-ray crystallographic data, absolute configuration and inhibition of cholinesterase. *Phytochem Let* 2018;27:44–48.
11. Feng J, Lee HJ, Kim SB, Jung JS, Lim SS, Suh HW. Antinociceptive effect of single components isolated from *Agrimonia pilosa* Ledeb. extract. *Sci Pharm* 2019;87(3):1–11.
12. Flann C. 2009-. Global Compositae Checklist, ed. Digitalni izvor: <http://compositae.landcareresearch.co.nz/> (pristup maj 2020. god.).
13. Giner RM, Recio M, Villalba M, Mañez S, Rios JL. Phenolic compounds of *Hieracium compositum* and *H. amplexicaule*. *Pharmazie* 1992;47(4):308.

14. Ghosh S, Chattopadhyay D, Mandal A, Kaity S, Samanta A. Bioactivity guided isolation of antiinflammatory, analgesic, and antipyretic constituents from the leaves of *Pedilanthus tithymaloides* (L.). *Med Chem Res* 2013;22(9):4347–4359.
15. Gökbulut A, Orhan N, Deliorman Orhan DD. Phenolic compounds characterization, carbohydrate digestive enzyme inhibitory and antioxidant activities of *Hieracium pannosum* Boiss. *S Afr J Bot* 2017;108:387–392.
16. Greuter W. 2006+. Compositae (pro parte majore). U: Compositae. Euro+Med Plantbase - the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity. Uredili: Greuter W, Raab-Straube E von. Digitalni izvor: <http://www2.bgbm.org/EuroPlusMed/PTaxonDetail.asp?NameCache=Hieracium&PTReffk=70000/> (pristup jun 2020. god.).
17. Hassler M. World Plants: Synonymic Checklists of the Vascular Plants of the World (verzija novembar 2018). U: Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2019 Annual Checklist. Uredili: Roskov Y, Ower G, Orrell T, Nicolson D, Bailly N, Kirk PM, Bourgoin T, DeWalt RE, Decock W, Nieukerken E. van, Zarucchi J, Penev L. Digitalni izvor: [www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019](http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019). Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands.
18. Hooper SN, Chandler RF. Herbal remedies of the Maritime Indians: phytosterols and triterpenes of 67 plants. *J Ethnopharmacol* 1984;10(2):181–194.
19. Johann S, Soldi C, Lyon JP, Pizzolatti MG, Resende MA. Antifungal activity of the amyirin derivatives and *in vitro* inhibition of *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells. *Lett Appl Microbiol* 2007;45(2):148–153.
20. Kanafin EN, Kishkentaeva AS, Kupryanov AN, Adenkov SM. Deacylcynaropicrin from *Hieracium bectauatensis*, U: Proceeding of International scientific and practical conference “Achievements and Prospects for the Development of Phytochemistry”, Karaganda, Kazakhstan, 2015, str. 122.
21. Kilian N, Gemeinholzer B, Lack WH. Cichorieae. U: Systematics, evolution and biogeography of Compositae. Uredili: Funk VA, Susanna A, Stuessy TF, Bayer RG. International Association for Plant Taxonomy, Vienna, Austria, 2009, str. 343–383.
22. Kilian N, Gemeinholzer B, Lack HW. "24. Cichorieae" (PDF). U: Systematics, evolution and biogeography of Compositae. Uredili: Funk VA, Susanna A, Stuessy TE, Bayer RJ. International Association for Plant Taxonomy, Vienna, Austria. Digitalni izvor: [https://www.bgbm.org/sites/default/files/documents/Cichorieae\\_Chapter24.pdf](https://www.bgbm.org/sites/default/files/documents/Cichorieae_Chapter24.pdf) (pristup 18.11.2016. god.).
23. Kim YS, Kim SH, Shin J, Harikishore A, Lim JK, Jung Y, Lyu HN, Baek NI, Choi KY, Yoon HS, Kim KT. Luteolin suppresses cancer cell proliferation by targeting vaccinia-related kinase 1. *PloS One* 2014;9(10):1–11.
24. Kukić J, Popović V, Petrović S, Mucaji P, Ćirić A, Stojković D, Soković M. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. *Food Chem* 2008;107(2):861–868.
25. Kuluev BR, Akhmetova GR, Shvets KY, Muldashev AA, Mavzyutov AR, Chemeris AV. Identification of the antimicrobial activity in extracts of potential rubber-bearing plants of the flora of the Southern Urals. *Biomics* 2019;11(1):71–85.
26. Labeled F, Masullo M, Mirra V, Nazzaro F, Benayache F, Benayache S, Piacente S. Amino acid-sesquiterpene lactone conjugates from the aerial parts of *Centaurea pungens* and evaluation of their antimicrobial activity. *Fitoterapia* 2019;133:51–55.
27. Lee JY, Cha MR, Kim MR, Lee K, Choi SU, Ryu SY. Two novel guaiane sesquiterpenes from the whole plant of *Youngia japonica*. *Planta Med Lett* 2015;2:31–34.
28. Li RB, Yang JS. Inhibitory effect of apigenin against migration and invasion of human lung cancer A549 cells and the related mechanism. *Acad J Second Mil Med Univ* 2015; 36:878–882.
29. Li J, Wang L, Bai H, Yang B, Yang H. Synthesis, characterization, and anti-inflammatory activities of rare earth metal complexes of luteolin. *Med Chem Res* 2011;20(1):88–92.
30. Mamadaliyeva NZ, Herrmann F, El-Readi MZ, Tahrani A, Hamoud R, Egamberdieva DR, Azimova SS, Wink, M. Flavonoids in *Scutellaria immaculata* and *S. ramosissima* (Lamiaceae) and their biological activity. *J Pharm Pharmacol* 2011;63(10):1346–1357.
31. Mráz P, Zdvorák P. Reproductive pathways in *Hieracium* s.s. (Asteraceae): strict sexuality in diploids and apomixis in polyploids. *Ann Bot* 2019;123(2):391–403.
32. Murade V, Deshmukh K, Murade R, Raut D, Chavan M, Hase D. Involvement of opioid receptors in antinociceptive activity of semi purified fraction and  $\beta$ -amyirin isolated from *Ricinus communis* Linn. leaves in mice. *Orient Pharm Exp Med* 2017;17(4):355–364.
33. Ndom JC, Mbafo J.T, Wansi JD, Kamdem AW, Meva LM, Vardamides JC, Toukam F, Pegyemb D, Ngando TM, Laatsch H, Fomum ZT. Sesquiterpene lactones from *Crepis cameroonica* (Asteraceae). *Nat Prod Res* 2006;20:435–442.
34. Niketić M, Bareka P, Kamari G. Karyosystematic study of selected *Hieracium* taxa (Compositae) from Durmitor Mt (Montenegro). *Bot Chron* 2003;16:23–45.
35. Niketić M, Vladimirov V, Mráz P. Chromosome numbers and taxonomic-chorological notes on selected species of *Hieracium* s. str. (Asteraceae) from Montenegro. *Phytol Balcan* 2006;12:85–97.

36. Otuki MF, Ferreira J, Lima FV, Meyre-Silva C, Malheiros A, Muller LA, Cani GS, Santos ARS, Yunes RA, Calixto JB. Antinociceptive properties of mixture of  $\alpha$ -amyrin and  $\beta$ -amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;313(1):310–318.
37. Perveen S, Al-Taweel AM, Yusufoglu HS, Fawzy GA, Foudah A, Abdel-Kader MS. Hepatoprotective and cytotoxic activities of *Anvillea garcinii* and isolation of four new secondary metabolites. *J Nat Med* 2018;72:106–117.
38. Petrović SD, Gorunović MS, Vajs V, Đermanović M. Triterpenoids from *Hieracium plumulosum* A. Kerner, L., Asteraceae. *Pharmazie* 1996;51:996–997.
39. Petrović SD, Löscher R, Gorunović MS, Merfort I. Flavonoid and phenolic acid patterns in seven *Hieracium* species. *Biochem Syst Ecol* 1999a;27:651–656.
40. Petrović SD, Gorunović MS, Wray V, Merfort I. A taraxasterol derivative and phenolic compounds from *Hieracium gymnocephalum*. *Phytochemistry* 1999b;50:293–296.
41. Petrović S, Dobrić S, Mimica-Dukić N, Simin N, Kukić J, Niketić M. The antiinflammatory, gastroprotective and antioxidant activities of *Hieracium gymnocephalum* extract. *Phytother Res* 2008;22:1548–1551.
42. Pinto SH, Pinto LMS, Guedes MA, Cunha GMA, Chaves MH, Santos FA, Rao VS. Antinociceptive effect of triterpenoid  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. *Phytomedicine* 2008;15(8):630–634.
43. dos Santos MD, Almeida MC, Lopes NP, De Souza GEP. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biol Pharm Bull* 2006;29(11):2236–2240.
44. Sareedenchai V, Zidorn C. Flavonoids as chemosystematic markers in the tribe Cichorieae of the Asteraceae. *Biochem Syst Ecol* 2010;38(5):935–957.
45. Sennikov AN, Illarionova ID. Carpological studies in Asteraceae – Cichorieae, 1. subtribe Hieraciinae. *Komarovia* 2002;2:97–125.
46. Shvets KY, Akhmetova GR, Baymiev AH, Mavzyutov AA, Baymiev AH, Khabirova AD, Zakirova GN, Khasanova GF. The microdilution method—universal method for determining the minimum inhibitory concentrations of substances of different nature. *Bacteriology* 2019;4(3):7–13
47. Švehlíková V, Mráz P, Piacente S, Marhold K. Chemotaxonomic significance of flavonoids and phenolic acids in the *Hieracium rohacsense* group (*Hieracium* sect. *Alpina*; Lactuceae, Compositae). *Biochem Syst Ecol* 2002;30:1037–1049.
48. Tatli II, Akdemir ZS, Yesilada E, Küpeli E. Anti-inflammatory and antinociceptive potential of major phenolics from *Verbascum salviifolium* Boiss. *Z Naturforsch C J Biosci* 2008;63(3–4):196–202.
49. Wu ZJ, Xu XK, Zeng HW, Shen YH, Tian JM, Su J, Li HL, Shan L, Liu RH, Zhang WD. New sesquiterpenoids from *Ainsliaea macrocephala* and their nitric oxide inhibitory activity. *Planta Med* 2011;77:1545–1550.
50. Yang YJ, Yao J, Jin XJ, Shi ZN, Shen TF, Fang JG, Yao XJ, Zhu Y. Sesquiterpenoids and tirucallane triterpenoids from the roots of *Scorzonera divaricata*. *Phytochemistry* 2016;124:89–98.
51. Yener I, Kocakaya SO, Ertas A, Erhan B, Kaplaner E, Oral EV, Yilmaz-Ozden T, Abdullah Yilmaz M, Ozturk M, Kolak U. Selective *in vitro* and *in silico* enzymes inhibitory activities of phenolic acids and flavonoids of food plants: relations with oxidative stress. *Food Chem* 2020;127045:1–9.
52. Zahn KH. Compositae (*Hieracium*). U: Das Pflanzenreich. Regni Vegeabilis Conspectus, IV. 280. Uredili: Engler A. Wilhelm Engelmann, Leipzig, 1921–1923, str. 1–288, 577–864.
53. Zaima K, Wakana D, Demizu Y, Kumeta Y, Kamakura H, Maruyama T, Kurihara M, Goda Y. Isoheleproline: A new amino acid-sesquiterpene adduct from *Inula helenium*. *J Nat Med* 2014;68:432–435.
54. Zheleva-Dimitrova D, Gevrenova R, Zaharieva MM, Najdenski H, Ruseva S, Lozanov V, Balabanova V, Yagi S, Momekov G, Mitev V. HPLC-UV and LC-MS analyses of acylquinic acids in *Geigeria alata* (DC) Oliv. & Hiern. and their contribution to antioxidant and antimicrobial capacity. *Phytochem Anal* 2017;28:176–184.
55. Zhu X, Zhang H, Lo R. Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities. *J Agric Food Chem* 2004;52(24):7272–7278.
56. Zidorn C, Ellmerer-Müller EP, Stuppner H. A germacranolide and three hydroxybenzyl alcohol derivatives from *Hieracium murorum* and *Crepis bocconi*. *Phytochem Anal* 2001;12:281–285.
57. Zidorn C, Gottschlich G, Stuppner H. Chemosystematic investigations on phenolics from flowerheads of Central European taxa of *Hieracium* sensu lato (Asteraceae). *Plant Syst Evol* 2002;231:39–58.
58. Zidorn C. Sesquiterpene lactones and their precursors as chemosystematic markers in the tribe Cichorieae of the Asteraceae. *Phytochemistry* 2008;69:2270–2296.
59. Ziyang L, Yongmei Z, Nan Z, Ning T, Baolin L. Evaluation of the anti-inflammatory activity of luteolin in experimental animal models. *Planta Med* 2007;73(3):221–226.

#### **4. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE**

##### **Naučni radovi publikovani u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)**

1. **Milutinović V**, Niketić M, Ušjak L, Nikolić D, Krunic A, Zidorn C, Petrović S. Methanol extracts of 28 *Hieracium* species from the Balkan Peninsula – Comparative LC–MS analysis, chemosystematic evaluation of their flavonoid and phenolic acid profiles and antioxidant potentials. *Phytochemical Analysis* 2018;29(1):30–47.  
2017: IF 2,337. Plant Sciences: 63/223.
2. **Milutinović V**, Niketić M, Krunic A, Nikolić D, Petković M, Ušjak L, Petrović S. Sesquiterpene lactones from the methanol extracts of twenty-eight *Hieracium* species from the Balkan Peninsula and their chemosystematic significance. *Phytochemistry* 2018;154:19-30.  
2016: IF 3,205. Plant Sciences: 34/212.

##### **Naučni rad publikovan u istaknutom međunarodnom časopisu (M22)**

1. **Milutinović V**, Pecikoza U, Tomić M, Stepanović-Petrović R, Niketić M, Ušjak L, Petrović S. Investigation of antihyperalgesic and antiedematous activities of three *Hieracium* species. *Natural Product Research* 2020. Doi: 10.1080/14786419.2020.1768086.  
2019: IF 2,158. Chemistry, Applied: 30/71.

##### **Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M34)**

1. **Milutinović V**, Petrović S, Niketić M, Krunic A, Nikolić D. Phytochemical analysis and antiradical potential of methanol extracts of *Hieracium naegelianum* Pančić and *H. scheppigianum* Freyn underground parts. 10th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries (CMAPSEEC 2018), Split, Croatia, 20-24. 05. 2018. Book of Abstracts, p. 113., P–56.

##### **Predavanje po pozivu sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M62)**

1. **Milutinović V**, Pecikoza U, Tomić M, Stepanović-Petrović R, Niketić M, Ušjak L, Petrović S. Ispitivanje antihiperalgezijske i antiedematozne aktivnosti ekstrakata nadzemnih delova u cvetu tri vrste roda *Hieracium*. 14. Kongres farmakologa Srbije i 4. Kongres kliničke farmakologije Srbije sa međunarodnim učešćem. Novi Sad, 18-21.09.2019. Zbornik kratkih sadržaja radova, str. 177. Sesija 9, Farmakologija prirodnih proizvoda.

##### **Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64)**

1. **Milutinović V**, Petrović S, Niketić M. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupne redukcione i anti-DPPH aktivnosti metanolnih ekstrakata osamnaest vrsta roda *Hieracium* L. VI Kongres Farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, Srbija, 15-19. 10. 2014. Zbornik sažetaka, str. 329–30.
2. **Milutinović V**, Niketić M, Petković M, Petrović S. Ispitivanje triterpena u dihlormetanskim ekstraktima 28 vrsta roda *Hieracium* L. (Asteraceae) sa Balkanskog poluostrva. VII Kongres Farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, Srbija, 10-14. 10. 2018. Arhiv za farmaciju 2018;68(3):714–5., LB–P18.
3. **Milutinović V**, Petrović P, Klaus A, Ušjak L, Niketić M, Petrović S. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of methanol extracts of 28 *Hieracium* species and their selected metabolites. 13th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Stara planina Mt., Serbia, June 20-23, 2019. Book of abstracts, p. 180. P–34.



4. **Milutinović V**, Matić I, Grozdanić-Stanisavljević N, Stanojković T, Soković M, Ćirić A, Niketić M, Petrović S. Cytotoxic and antimicrobial activity of selected *Hieracium* L. extracts and isolated sesquiterpene lactones. 13th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Stara planina Mt., Serbia, June 20-23, 2019. Book of abstracts, pp. 162–163. P–15.

## 5. ZAKLJUČAK - OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

U okviru doktorske disertacije kandidatkinje mag. farm. Violete M. Milutinović izvršena je hemijska i farmakološka karakterizacija 28 vrsta roda *Hieracium* s. str. sa Balkanskog poluostrva.

Seskviterpenski laktoni su u svih 28 vrsta identifikovani po prvi put. Iz MeOH ekstrakta cvasti *H. calophyllum* izolovana su četiri seskviterpenska laktona: gvajanolid krepizid E i tri do sada neopisana konjugata sa prolinom - eudezmanolid kalofilamin B i gvajanolidi kalofilamin A i 8-epi-ikserisamin A. Konjugati seskviterpenskog laktona sa prolinom su inače vrlo retki u prirodi i do sada su identifikovani samo u nekoliko vrsta drugih rodova porodice Asteraceae. Što se tiče krepizida E, on je u okviru ove doktorske disertacije identifikovan po prvi put u vrstama roda *Hieracium*. Izvršena je i kvalitativna i kvantitativna LC-MS analiza seskviterpenskog laktona u MeOH ekstraktima podzemnih organa *H. scheppigianum* i *H. naegelianum*, i herbi svih 28 ispitivanih vrsta. Dva nova gvajanolida identifikovana su u herbama svih 28 vrsta, a sva tri nova seskviterpenska laktona u herbama 14 vrsta, dok je krepizid E detektovan u herbama većine (tj. 26) ispitivanih vrsta. U podzemnim organima *H. scheppigianum* i *H. naegelianum*, od seskviterpenskog laktona identifikovan je samo krepizid E, ali su se oni ujedno pokazali kao bogati izvori ovog gvajanolida.

Od 28 vrsta koje su predmet ove doktorske disertacije, analiza fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida sprovedena je po prvi put za 20 vrsta. Za preostalih osam vrsta, podaci o sastavu ove dve klase sekundarnih metabolita su značajno upotpunjeni (u njima je dodatno identifikovano od sedam do deset jedinjenja).

Pet fenolkarboksilnih kiselina izolovano je iz suvog MeOH ekstrakta podzemnih organa *H. scheppigianum*: hlorogenska, 3,5-, 1,5- i 3,4-di-*O*-kafeoilhina kiselina, a po prvi put iz vrste roda *Hieracium*, i 1,3-di-*O*-kafeoilhina kiselina. Izvršena je i uporedna kvalitativna i kvantitativna LC-MS analiza fenolkarboksilnih kiselina u suvim MeOH ekstraktima podzemnih organa *H. scheppigianum* i *H. naegelianum*, i zaključeno da su oba značajni izvori ove klase sekundarnih biljnih metabolita. Sprovedena je i uporedna kvalitativna i kvantitativna LC-MS analiza fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida u suvim MeOH ekstraktima herbi svih 28 vrsta, koja je ukazala na njihovu međusobnu kvalitativnu sličnost, ali i na odgovarajuće razlike. U ekstraktima herbi detektovano je ukupno pet fenolkarboksilnih kiselina i 19 flavonoida, i konstatovano da većina predstavlja značajne izvore heterozida luteolina, što je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima vrsta ovog roda.

Kvalitativna i kvantitativna GC-FID-MS analiza triterpena u suvim CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ekstraktima herbi 26 vrsta roda *Hieracium* izvršena je po prvi put, dok su u slučaju dve prethodno ispitivane vrste dodatno identifikovana dva triterpena. Nepolarni CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ekstrakti pojedinih vrsta pokazali su se kao naročito bogati izvori triterpenskog jedinjenja (što je takođe u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima vrsta ovog roda).

Poseban naučni doprinos ove doktorske disertacije ogleda se u tome što je multivarijantnim statističkim metodama (PCA, nMDS i UPGMA) pokazan homosistematski značaj seskviterpenskog laktona, flavonoida, fenolkarboksilnih kiselina i triterpena identifikovanih u ekstraktima herbi svih 28 vrsta. Rezultati dobijeni za sve ispitivane klase sekundarnih metabolita podržavaju diferencijaciju između glavnih grupa i u skladu su sa trenutno prihvaćenom taksonomskom klasifikacijom roda *Hieracium*. Kao najpouzdaniji homosistematski markeri pokazali su se flavonoidi i fenolkarboksilne

kiseline. Naime, statistička analiza ovih polifenola dodatno je pokazala izdvajanje hibridogenih vrsta i njihovo pozicioniranje uglavnom između roditeljskih vrsta.

U okviru ove doktorske disertacije po prvi put je ispitana antioksidantna aktivnost suvih MeOH ekstrakata herbi odabranih 28 vrsta roda *Hieracium*. Dobijeni podaci bili su u korelaciji sa sadržajem ukupnih polifenola, kao i sa sadržajem pojedinih fenolkarboksilnih kiselina i flavonoida u ovim ekstraktima. Može se zaključiti da svih 28 vrsta predstavljaju nove izvore jedinjenja koja su poznati snažni antioksidansi.

Antimikrobna aktivnost na osnovu hemijskog sastava odabranih suvih ekstrakata herbi (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ekstrakta *H. scheppigianum* i MeOH ekstrakata *H. calophyllum*, *H. coloriscapum*, *H. pseudoschenkii*, *H. valdepiosum* i *H. glabratum*), kao i 8-epi-ikserisamina A ispitana je po prvi put, dok su postojeći podaci o antimikrobnoj aktivnosti krepizida E značajno upotpunjeni u okviru ove doktorske disertacije. Dobijeni podaci za ova dva seskviterpenska laktona (tj. ustanovljena slična aktivnost za jedinjenja koja se razlikuju samo po prisustvu prolina u strukturi 8-epi-ikserisamina A) predstavljaju značajan doprinos ispitivanju konjugata seskviterpenskih laktona sa prolinom kao potencijalnih *prodrug* oblika.

Osim u slučaju krepizida E, citotoksična aktivnost odabranih suvih ekstrakata herbi (istih onih za koje je ispitivana i antimikrobna aktivnost), kao i 8-epi-ikserisamina A je po prvi put ispitana u okviru ove doktorske disertacije. Krepizid E je u odnosu na 8-epi-ikserisamin A pokazao bolji citotoksični efekat, što je u saglasnosti sa njihovom strukturom, tj. prisustvom prolina kod 8-epi-ikserisamina A umesto aktivne  $\alpha$ -metilenske grupe na  $\gamma$ -laktonu krepizida E. Rezultati dobijeni ispitivanjem citotoksičnosti prema normalnim MRC-5 ćelijama ukazali su na potencijalnu bezbednost primene ovih izolata.

Po prvi put je ispitana i antiholinesterazna aktivnost izolata vrsta roda *Hieracium*. Utvrđena aktivnost suvih MeOH ekstrakata herbi svih 28 ispitivanih vrsta ovog roda može se, makar delom, objasniti prisustvom odabranih testiranih jedinjenja (flavonoida, fenolkarboksilnih kiselina i seskviterpenskih laktona). Ustanovljene značajne razlike u antiholinesteraznoj aktivnosti ovih sekundarnih metabolita, kao i razlike u aktivnosti pojedinačnih jedinjenja prema AChE i BChE, daju dobru osnovu za dalja *in silico* istraživanja odnosa njihove strukture i aktivnosti.

Ispoljavanje antihiperalgezijskog uz izostanak antiedematoznog efekta može ukazivati na to da ispitivani suvi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ekstrakt *H. scheppigianum* i MeOH ekstrakti *H. glabratum* i *H. calophyllum* u ispitivanom rasponu doza uglavnom utiču na centralne mehanizme transmisije/modulacije bola, što je prethodno pokazano i za pojedine triterpene i flavonoide identifikovane u ovim ekstraktima. Može se zaključiti da ispitivani ekstrakti predstavljaju nove izvore jedinjenja sa antihiperalgezijskom aktivnošću. Bezbednost primene ekstrakata *H. scheppigianum* i *H. glabratum*, koji su pokazali značajnu antihiperalgezijsku aktivnost, pokazana je rotarod testom u pacova i testom akutne toksičnosti u miševa.

Generalno se može zaključiti da su rezultati ispitivanja sprovedenih u ovoj doktorskoj disertaciji omogućili uvid u kompoziciju sekundarnih metabolita od značaja za farmaciju - seskviterpenskih laktona, flavonoida, fenolkarboksilnih kiselina i triterpena, u odgovarajućim ekstraktima svih 28 vrsta roda *Hieracium*. Za najveći broj (19) vrsta hemijska karakterizacija je sprovedena po prvi put, dok su za one prethodno hemijski ispitivane podaci o kompoziciji sekundarnih metabolita značajno upotpunjeni. Posebno treba istaći da su u okviru ove doktorske disertacije izolovana tri nova, tj. do sada neopisana seskviterpenska laktona - konjugata sa prolinom. Konjugati seskviterpenskih laktona sa prolinom su vrlo retki u prirodi i do sada su identifikovani samo u nekoliko vrsta drugih rodova porodice Asteraceae. Multivarijantna statistička analiza rezultata hemijskih ispitivanja omogućila je utvrđivanje sistematskog položaja ispitivanih taksona različitog ranga na osnovu kompozicije analiziranih sekundarnih metabolita, tj. utvrđivanje hemosistematskog značaja analiziranih metabolita. Rezultati dobijeni ispitivanjem farmakološke aktivnosti (antioksidantne, antimikrobne, citotoksične, antiholinesterazne, antihiperalgezijske i antiedematozne), kao i rezultati ispitivanja bezbednosti primene za odabrane, prethodno hemijski okarakterisane ekstrakte i/ili sekundarne metabolite vrsta roda *Hieracium* ukazali su na njihov lekoviti potencijal i opravdanost daljih istraživanja u cilju iznalaženja novih biljnih lekovitih sirovina.

## 6. MIŠLJENJE I PREDLOG KOMISIJE

Na osnovu pregleda doktorske disertacije mag. farm. Violete M. Milutinović pod nazivom „Ispitivanje sekundarnih metabolita i farmakološke aktivnosti odabranih vrsta roda *Hieracium* L. (Asteraceae) sa Balkanskog poluostrva“ može se zaključiti da je kandidatkinja ispunila postavljene ciljeve i da rezultati prikazani u disertaciji predstavljaju originalan i značajan naučni doprinos. Iz rezultata koji predstavljaju deo ove doktorske disertacije publikovana su dva rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21) i jedan rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22) i prikazan veći broj saopštenja na skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja štampanih u izvodu.

Na osnovu svega izloženog, Komisija sa velikim zadovoljstvom predlaže Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta da prihvati pozitivan Izveštaj i da po dobijanju saglasnosti Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu odobri mag. farm. Violeti M. Milutinović javnu odbranu doktorske disertacije.

Beograd, 07.05.2021. god.

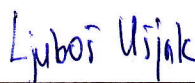


Dr sc. Silvana Petrović, redovni profesor, mentor  
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Članovi Komisije:



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



Dr sc. Ljuboš Ušjak, naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet



Dr sc. Miloš Petković, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet



Dr sc. Maja Tomić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

## OCENA IZVEŠTAJA O PROVERI ORIGINALNOSTI DOKTORSKE DISERTACIJE

Na osnovu *Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu* i nalaza u izveštaju iz programa *iThenticate* kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije „**Ispitivanje sekundarnih metabolita i farmakološke aktivnosti odabranih vrsta roda *Hieracium* L. (Asteraceae) sa Balkanskog poluostrva**”, autora Violete M. Milutinović, konstatujem da utvrđeno podudaranje teksta (*Similarity Index*) iznosi 11% (ukupno 689 podudaranja sa 195 izvora).

Ovaj stepen podudarnosti pretežno je posledica prethodno publikovanih rezultata doktorandovih istraživanja koji su proistekli iz ove doktorske disertacije (sa 3 publikovana naučna rada ustanovljeno je poklapanje 2%, 1% i <1%, redom), upotrebe uobičajene terminologije za ovu naučnu oblast istraživanja (npr. latinski nazivi biljaka, nazivi jedinjenja ili delovi ovih naziva), u nekim slučajevima slične ili iste aparature i slične metodologije (npr. utvrđeno je poklapanje po 1% sa dve doktorske disertacije iz iste naučne oblasti), navođenja citirane literature u tekstu doktorske disertacije i tzv. opštih mesta i podataka (npr. zvanja članova komisije, nazivi ustanova, gradova i država), što je u skladu sa članom 9. *Pravilnika*. Sa izuzetkom četiri gore navedena izvora, u slučaju svih ostalih izvora poklapanje iznosi po <1%.

Na osnovu svega iznetog, a u skladu sa članom 8. stav 2. *Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu*, izjavljujem da izveštaj ukazuje na originalnost doktorske disertacije, te se propisani postupak pripreme za njenu odbranu može nastaviti.

Sa rezultatom provere originalnosti doktorske disertacije upoznati su ostali članovi Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije.

Beograd, 07.05.2021. god.

Mentor



Dr sc. Silvana Petrović, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet